



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**Avaliação estrutural e reológica de emulsões simples e múltiplas  
estabilizadas por caseinato de sódio e jataí**

**Fabiana de Assis Perrechil**

Engenheira de Alimentos, 2005 (UNICAMP)

**Profa. Dra. Rosiane Lopes da Cunha**

Orientadora

Dissertação apresentada à comissão de pós-graduação da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos

Campinas, Março de 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

P426a Perrechil, Fabiana de Assis  
Avaliação estrutural e reológica de emulsões simples e múltiplas  
estabilizadas por caseinato de sódio e jataí / Fabiana de Assis Perrechil.  
-- Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: Rosiane Lopes Cunha  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Emulsões. 2. Caseinato de sódio. 3. Goma jataí. 4.  
Reologia. 5. Microestrutura. I. Cunha, Rosiane Lopes. II.  
Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de  
Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

Título em inglês: Structural and rheological evaluation of simple and multiple emulsions  
stabilized by sodium caseinate and LGB

Palavras-chave em inglês (Keywords): Emulsions, Sodium caseinate, Locust bean gum,  
Rheology, Microstructure

Titulação: Mestre em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora: Rosiane Lopes Cunha

Delia Rita Tapia Blácido

Jane Selia dos Reis Coimbra

Flavia Maria Netto

Programa de Pós Graduação: Programa em Engenharia de Alimentos

## **BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Rosiane Lopes da Cunha

Faculdade de Engenharia de Alimentos – Departamento de Engenharia de Alimentos – UNICAMP  
Orientadora

---

Dra. Delia Rita Tapia Blácido

Faculdade de Engenharia de Alimentos – Departamento de Engenharia de Alimentos – UNICAMP  
Membro

---

Profa. Dra. Flavia Maria Netto

Faculdade de Engenharia de Alimentos – Departamento de Alimentos e Nutrição – UNICAMP  
Membro

---

Profa. Dra. Jane Selia dos Reis Coimbra

Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas – Departamento de Tecnologia de Alimentos – UFV  
Membro





*Aos meus pais que sempre me guiaram e nunca me  
deixaram perder o caminho que deveria seguir.  
À Rosi e Ana Braga que sempre acreditaram e  
investiram em mim.*



## AGRADECIMENTOS

*À Faculdade de Engenharia de Alimentos e seus professores e funcionários pela oportunidade de realização deste trabalho.*

*À Fapesp e ao CNPq pelas bolsas de mestrado concedidas e pelo suporte financeiro.*

*Ao Departamento de Genética e Evolução pela disponibilização da ultracentrífuga e do microscópio de fluorescência, em especial ao Prof. Dr. Marcelo Menossi, à Edna, Lúcia e Grazi.*

*À Niro Soavi pelo empréstimo do homogeneizador de alta pressão, em especial, ao Rodrigo e ao Leandro.*

*À banca examinadora pelas correções que, com certeza, contribuíram muito para a melhoria do conteúdo apresentado neste trabalho.*

*À Profa. Dra. Rosiane Lopes da Cunha, gostaria de agradecer não só à orientação, mas também ao incentivo, confiança, apoio, inúmeros conselhos e principalmente por ser um exemplo de profissional que desejo ser.*

*À Ana Braga, simplesmente obrigada por tudo o que você fez por mim! É muito difícil colocar em poucas palavras todo o carinho e gratidão que tenho por você, mas acho que sabemos tudo o que passamos juntas. Você foi minha maior incentivadora e pode ter certeza que, mesmo longe, me lembro de todos os seus conselhos e ensinamentos para melhorar meu trabalho a cada dia.*

*Ao Gabriel, meu grande amor, muito obrigada por seu amor, carinho, amizade, companheirismo, compreensão, apoio, paciência, e por tudo o que vivemos juntos nesses anos. Seu amor me fortalece e me ajuda a seguir em frente.*

*Aos meus pais, Julio e Suely, e aos meus irmãos Marcus e Leca, muito obrigada por sempre me apoiarem, por vibrarem comigo a cada conquista e, principalmente, por não me deixarem nunca desistir dos meus sonhos.*

*À Aninha... muito obrigada pela sua amizade, pela sua paciência pra agüentar todos os meus desabafos, pelas inúmeras discussões sobre meus resultados, pelas risadas, pelos choros, pelas*

*noites no laboratório, pela companhia nas viagens, natação, capoeira, corridas, barzinhos, cafés, filmes, etc... Com certeza esse trabalho é também um pouquinho seu!*

*Às minhas irmãzinhas de coração Aninha (Ana Cláudia), Martha, Reichel, Rezinha, Rezona, Sabrina, às vizinhas Aldinha e Kanae e à “agregada” Melina ... muito obrigada por todas as risadas, as conversas no fim de noite, as baladas, dias de estudo, e principalmente pelo carinho e amizade de vocês.*

*À família de Campinas Nenis e Nat, obrigada por estarem sempre presentes em minha vida e cuidarem de mim como uma verdadeira família!*

*Aos amigos sempre presentes Carol, Mococa, Marquinhos e Marcela, muitíssimo obrigada pelo carinho e amizade de vocês. Com certeza são muito especiais pra mim.*

*Aos meus queridos amigos do mestrado que sempre me apoiaram e me deram forças em todos os momentos que precisei, em especial, Andrea, Cesar, Felipe, Marcão, Carolzinha, Caricas, Wagner, Vitor, Rosana, Follegatti.*

*Aos meus “veteranos” sempre presentes Lizi, Roque, Geraldo, Abraão, Ale e Márcia.*

*Aos colegas do grupo de pesquisa, em especial ao Ângelo, Joicinha, Pablo e Ângela, e às “meninas da salinha”, Lou, Cris, Rê, Ana P. e Leila, muito obrigada pela companhia em todos os dias de trabalho, pelas dúvidas resolvidas e por todos os momentos divertidos.*

*À Joyce e D. Ana, muito obrigada pelas inúmeras ajudas no laboratório!*

*À todos que de alguma forma contribuíram de alguma forma para a elaboração deste trabalho.*

## ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE TABELAS .....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xii
NOMENCLATURA / ABREVIACÕES .....	xv
RESUMO GERAL .....	xvii
ABSTRACT .....	xix
CAPÍTULO 1. Introdução e objetivos .....	1
1.1. Introdução .....	3
1.2. Objetivos .....	4
CAPÍTULO 2. Revisão Bibliográfica .....	5
2.1. Emulsões .....	7
2.2. Biopolímeros .....	10
2.2.1. Caseínas .....	10
2.2.2. Galactomananas .....	10
2.3. Interações proteínas - polissacarídeos .....	11
2.4. Emulsões água-água (A/A) .....	15
2.5. Emulsões múltiplas .....	16
2.6. Reologia de emulsões .....	17
2.6.1. Sólidos .....	18
2.6.2. Líquidos .....	19
2.6.3. Plásticos .....	21
2.6.4. Materiais viscoelásticos .....	21
CAPÍTULO 3. Material e métodos .....	23
3.1. Material .....	25
3.2. Preparo dos sistemas .....	25
3.2.1. Preparo das soluções estoque dos biopolímeros .....	25
3.2.2. Preparo das emulsões óleo-água (O/A) .....	25
3.2.3. Preparo e avaliação da compatibilidade das misturas de biopolímeros .....	26
3.2.4. Preparo das emulsões água-água (A/A) .....	27
3.2.5. Preparo das emulsões múltiplas .....	27
3.3. Análises .....	27
3.3.1. Análises químicas .....	27
3.3.2. Análise da razão de volumes .....	28
3.3.3. Avaliação da estabilidade à cremeação .....	28
3.3.4. Medidas reológicas .....	29
3.3.5. Microscopia ótica e análise de imagens .....	30
3.3.6. Técnica de espalhamento de luz .....	31
3.3.7. Microscopia de fluorescência .....	31
3.3.8. Análise Estatística .....	31
CAPÍTULO 4. Resultados e discussões .....	33
Parte 1. Estudo de emulsões óleo-água estabilizadas por Na-CN .....	33
4.1. Emulsões em pH neutro .....	35
4.1.1. Variação na concentração dos componentes .....	35
4.1.2. Efeito da adição de LBG .....	49
4.1.3. Efeito da pressão na homogeneização das emulsões .....	56

4.2.	Influência da variação do pH em emulsões O/A estabilizadas por caseinato de sódio..	62
Parte 2. Estudo de emulsões A/A e emulsões múltiplas estabilizadas por caseinato de sódio e LBG .....		71
4.3.	Avaliação da compatibilidade de sistemas mistos Na-CN – LBG .....	73
4.3.1.	Compatibilidade de sistemas em pH neutro .....	73
4.3.2.	Influência da força iônica na compatibilidade dos sistemas.....	75
4.3.3.	Compatibilidade dos sistemas com a variação do pH .....	77
	✓ <i>Acidificação direta com HCl</i> .....	77
	✓ <i>Acidificação das soluções de proteína e polissacarídeo separadamente</i> .....	77
	✓ <i>Acidificação lenta com adição de GDL</i> .....	78
4.4.	Construção de diagrama de fases.....	79
4.5.	Emulsões água – água (A/A) .....	81
4.6.	Emulsões múltiplas.....	88
CAPÍTULO 5. Conclusões gerais .....		93
CAPÍTULO 6. Referências Bibliográficas.....		97
ANEXO 1. Metodologias para determinação do tamanho médio de gotas.....		105
	Análise de imagens .....	107
ANEXO 2. Medidas reológicas das emulsões estabilizadas por 1 e 4 % (m/v) Na-CN com variadas concentrações de óleo (10 a 60 % v/v) em pH 7,0.....		111
ANEXO 3. Medidas reológicas oscilatórias das emulsões estabilizadas por 1, 1,4 e 4 % (m/v) Na-CN com variadas concentrações de óleo (10 a 60 % v/v) em pH 7,0 .....		115

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 2.1.</b> Taxas de deformação típicas observadas em alguns processos relevantes para emulsões alimentícias.....	20
<b>Tabela 4.1.</b> Índice de cremeação das emulsões estabilizadas por Na-CN mensurado pelo volume da fase inferior.....	36
<b>Tabela 4.2.</b> Composição química da solução inicial das emulsões e de suas fases separadas após 7 dias de estocagem.....	38
<b>Tabela 4.3.</b> Valores de $d_{32}$ ( $\mu\text{m}$ ) para emulsões estabilizadas por caseinato de sódio.....	42
<b>Tabela 4.4.</b> Efeito das concentrações dos ingredientes no índice de consistência (k), índice de comportamento (n), tensão residual ( $\sigma_0$ ) e viscosidade ( $\eta$ ) a $100\text{ s}^{-1}$ da fase superior das emulsões estabilizadas por caseinato de sódio.....	45
<b>Tabela 4.5.</b> Efeito da concentração dos ingredientes na viscosidade ( $\eta$ ) (mPa.s) da fase inferior das emulsões estabilizadas por caseinato de sódio.....	46
<b>Tabela 4.6.</b> Composição química das fases separadas de emulsões estabilizadas por 1 % (m/v) de caseinato de sódio com adição de LBG.....	51
<b>Tabela 4.7.</b> Valores de diâmetro médio superficial das gotas ( $d_{32}$ ) ( $\mu\text{m}$ ) para emulsões estabilizadas por 1% de caseinato de sódio e diferentes concentrações de LBG.....	53
<b>Tabela 4.8.</b> Efeito da concentração de LBG no índice de consistência (k), índice de comportamento (n), tensão residual ( $\sigma_0$ ) e viscosidade ( $\eta$ ) a $100\text{ s}^{-1}$ das emulsões contendo 1 % Na-CN (m/v) e 30 % óleo (v/v).....	56
<b>Tabela 4.9.</b> Efeito da aplicação de pressão no diâmetro médio das gotas ( $d_{32}$ ) ( $\mu\text{m}$ ) das emulsões contendo 1 % (m/v) Na-CN e 30 % (v/v) óleo.....	59
<b>Tabela 4.10.</b> Composição química das fases separadas das emulsões acidificadas.....	65
<b>Tabela 4.11.</b> Diâmetro médio superficial das gotas ( $d_{32}$ ) ( $\mu\text{m}$ ) das emulsões estabilizadas por 1 % (m/v) de caseinato de sódio, contendo 30 % (v/v) de óleo e diferentes valores de pH final.....	67
<b>Tabela 4.12.</b> Efeito do pH na viscosidade ( $\eta$ ) a 10 e $100\text{ s}^{-1}$ das emulsões contendo 1 % (m/v) Na-CN e 30 % (v/v) óleo.....	70
<b>Tabela 4.13.</b> Composição das fases de sistemas em pH 7,0.....	74
<b>Tabela 4.14.</b> Composição das fases de sistemas com adição de $\text{CaCl}_2$ .....	76
<b>Tabela 4.15.</b> Ajustes reológicos das curvas de escoamento.....	87

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 2.1.</b> Representação esquemática dos mecanismos de instabilidade das emulsões O/A. Fonte: McClements (2005).....	8
<b>Figura 2.3.</b> Ilustração esquemática da estrutura da LBG, goma tara, goma guar e “fenugreek”. Fonte: Garti e Lesser (2001).....	11
<b>Figura 2.4.</b> Diagrama de fases típico em coordenadas retangulares para uma solução mista proteína-polissacarídeo. Fonte: Adaptado de Musampa et al. (2007).....	14
<b>Figura 2.5.</b> Representação esquemática da produção de uma emulsão água-água (A/A) a partir de uma solução aquosa de fases separadas. Fonte: McClements (2006). ....	15
<b>Figura 2.6.</b> Representação esquemática de uma emulsão múltipla A/O/A. Fonte: Garti e Benichou (2004). ....	16
<b>Figura 2.7.</b> Representação esquemática da produção de uma emulsão óleo-água-água (O/A/A) a partir de um sistema de fases separadas. Fonte: McClements (2006). ....	17
<b>Figura 4.1.</b> Efeito da concentração de óleo no perfil de cremação de emulsões óleo-água com 1 % (m/v) de caseinato de sódio após 7 dias de estocagem. ....	36
<b>Figura 4.2.</b> Micrografia das emulsões O/A com 1 % (m/v) de caseinato de sódio e concentração de óleo de 60 % (v/v) preparadas para avaliação na técnica de espalhamento de luz. Barra da escala = 100 $\mu$ m.....	39
<b>Figura 4.3.</b> Microestruturas de emulsões O/A com concentração de caseinato de sódio de 1 %, 1,4 % e 4 % (m/v) e concentração de óleo de 10 %, 30 % e 60 % (v/v). ....	41
<b>Figura 4.4.</b> Propriedades reológicas das emulsões O/A estabilizadas por 1,4 % (m/v) Na-CN com diferentes concentrações de óleo. A) Curva de escoamento da fase superior da amostra contendo 1,4 % (m/v) Na-CN e 10 % (v/v) óleo (dependência do tempo), B) curvas de escoamento da fase superior das emulsões e C) curvas de escoamento da fase inferior das emulsões. Concentração de óleo: ( $\diamond$ ) 10 %, ( $-$ ) 20 %, ( $\times$ ) 30 %, ( $\square$ ) 40 %, ( $\triangle$ ) 50 % e ( $\circ$ ) 60 % (v/v). ....	43
<b>Figura 4.5.</b> Propriedades reológicas dinâmicas da fase superior das emulsões O/A estabilizadas por 1,4 % (m/v) Na-CN com diferentes concentrações de óleo. Variação do A) módulo elástico ( $G'$ ) (símbolos abertos) e módulo viscoso ( $G''$ ) (símbolos fechados) com a frequência (no detalhe o comportamento da emulsão composta por 4 % (m/v) Na-CN e 60 % (v/v) óleo), B) módulo complexo ( $G^*$ ) com a frequência para diferentes concentrações de óleo e C) módulo complexo ( $G^*$ ) com a frequência para diferentes concentrações de proteína. Concentração de óleo: ( $\diamond$ ) 10 %, ( $-$ ) 20 %, ( $\times$ ) 30 %, ( $\square$ ) 40 %, ( $\triangle$ ) 50 % e ( $\circ$ ) 60 % (v/v).....	47
<b>Figura 4.6.</b> Aspecto visual das emulsões óleo-água contendo 1 % (m/v) de caseinato de sódio, 30 % (v/v) de óleo e concentração de LBG de 0,05, 0,1, 0,5 e 0,8 % (m/v). ....	50
<b>Figura 4.7.</b> Efeito da concentração de LBG no índice de cremação das emulsões estabilizadas por 1 % (m/v) de caseinato de sódio contendo 30 % (v/v) de óleo. Concentração de LBG: ( $\diamond$ ) 0 %, ( $\times$ ) 0,05 %, ( $\square$ ) 0,1 %, ( $\triangle$ ) 0,5 % e ( $\circ$ ) 0,8 % (m/v). ....	50
<b>Figura 4.8.</b> Microestruturas de emulsões O/A com 1 % (m/v) de caseinato de sódio, 30 % (v/v) de óleo e concentração de LBG de 0, 0,01 %, 0,05 %, 0,1 %, 0,5 % e 0,8 % (m/v). Barra de escala = 100 $\mu$ m .....	52
<b>Figura 4.9.</b> Efeito da concentração de LBG (% m/v) nas propriedades reológicas das emulsões estabilizadas por 1 % (m/v) caseinato de sódio contendo 30 % (v/v) de óleo. A) Curva de escoamento da fase superior das amostras, B) curvas de escoamento da fase inferior das	



amostras (no detalhe a curva de escoamento da fase inferior da emulsão adicionada de 0,5 % LBG na solução inicial) e C) módulo complexo ( $G^*$ ) da fase superior. Concentração de LBG: ( $\diamond$ ) 0 %, ( $\times$ ) 0,05 %, ( $\square$ ) 0,1 %, ( $\triangle$ ) 0,5 % e ( $\circ$ ) 0,8 % (m/v).....	54
<b>Figura 4.10.</b> Diferentes tipos de válvulas utilizadas no processo de homogeneização das emulsões. A) válvula que produz menor cisalhamento, B) válvula específica para a aplicação de altas pressões em emulsões e C) representação esquemática das válvulas. ....	57
<b>Figura 4.11.</b> Aspecto visual das emulsões homogeneizadas a 100 bar de pressão utilizando-se a válvula 1. A) Emulsão composta por 1 % (m/v) Na-CN e 30 % (v/v) óleo e B) emulsão O/A (30 % v/v óleo) sem adição de emulsificante. ....	58
<b>Figura 4.12.</b> Microestrutura da emulsão composta por 1 % (m/v) Na-CN e 30 % (v/v) óleo homogeneizada a 100 bar de pressão utilizando-se a válvula 1. Barra da escala = 20 $\mu\text{m}$ . ...	58
<b>Figura 4.13.</b> Variação do diâmetro médio das gotas com o aumento da pressão.....	60
<b>Figura 4.14.</b> Efeito da pressão de homogeneização nas curvas de escoamento das emulsões O/A estabilizadas por 1 % (m/v) de caseinato de sódio e contendo 30 % (v/v) de óleo.....	61
<b>Figura 4.15.</b> Efeito da pressão de homogeneização nos parâmetros reológicos das emulsões O/A estabilizadas por 1 % (m/v) de caseinato de sódio e contendo 30 % (v/v) de óleo. A) Índice de comportamento e B) viscosidade a taxa de deformação de $10 \text{ s}^{-1}$ . ....	62
<b>Figura 4.16.</b> Emulsões óleo-água compostas por 1 % (m/v) de caseinato de sódio, 30 % (v/v) de óleo e razões GDL/caseinato de 0,021, 0,083, 0,135, 0,45 e 3,8.....	62
<b>Figura 4.17.</b> Efeito da razão GDL/Na-CN: (A) nos valores de pH e (B) no índice de cremação das emulsões estabilizadas por 1 % (m/v) de caseinato de sódio e contendo 30 % (v/v) de óleo. ....	63
<b>Figura 4.18.</b> Microestruturas de emulsões O/A com 1 % de caseinato de sódio, 30 % de óleo e diferentes razões GDL/proteína: 0, 0,021, 0,083, 0,135, 0,45 e 3,8.....	66
<b>Figura 4.19.</b> Medidas reológicas em estado estacionário e dinâmicas para emulsões contendo 1 % (m/v) de caseinato de sódio, 30 % (v/v) de óleo e pH variando entre 2,7 e 7,0. A) Curva de escoamento da fase superior das amostras, B) módulo complexo ( $G^*$ ) da fase superior das emulsões e C) curvas de escoamento da fase inferior das amostras (no detalhe as curvas de escoamento da fase inferior das emulsões com valores de pH 5,0 e 3,7). pH: ( $\diamond$ ) 7,0, ( $-$ ) 6,6, ( $\times$ ) 5,6, ( $\square$ ) 5,0, ( $\triangle$ ) 3,7 e ( $\circ$ ) 2,7.....	68
<b>Figura 4.20.</b> Sistemas formados por caseinato de sódio e jataí em pH 7,0. No destaque tem-se o aspecto visual típico destas misturas após centrifugação. ....	74
<b>Figura 4.21.</b> Sistemas formados por caseinato de sódio e jataí estudados em diferentes condições de força iônica. A linha indica o limiar entre as duas fases separadas.....	75
<b>Figura 4.22.</b> Sistemas formados por caseinato de sódio e jataí acidificados com HCl a diferentes valores de pH. ....	77
<b>Figura 4.23.</b> Sistemas formados por soluções de caseinato de sódio e jataí acidificadas separadamente com HCl até alcançar diferentes valores de pH. ....	78
<b>Figura 4.24.</b> Sistemas formados por soluções de caseinato de sódio e jataí acidificadas lentamente através da adição de GDL até o alcance de diferentes valores de pH.....	79
<b>Figura 4.25.</b> Diagramas visuais de fases para o sistema caseinato de sódio-jataí acidificado com diferentes razões GDL/proteína: A) 0,083 ( $\text{pH}_{\text{final}} = 5,5$ ) e B) 3,8 ( $\text{pH}_{\text{final}} = 2,5$ ). ( $\times$ ) região de 1 fase, ( $\square$ ) região de 2 fases e ( $\blacksquare$ ) região de 2 fases com gelificação da fase inferior. A linha pontilhada representa uma tendência de separação de fases. ....	80
<b>Figura 4.26.</b> Caracterização química, reológica e microestrutural dos sistemas. A) Linha de amarração da mistura 4 % (m/v) Na-CN – 0,4 % (m/v) LBG em pH 5,5 e microestrutura por fluorescência, B) curvas de escoamento e ajustes das curvas aos modelos reológicos e	

C) variação da viscosidade com a taxa de deformação. (▲) Solução inicial, (×) fase superior e (○) fase inferior. Barra da escala = 100 μm. ....	82
<b>Figura 4.27.</b> Aspecto visual das emulsões A/A após desestabilização: (A) FS1FI3, (B) FS2FI2 e (C) FS3FI1. ....	85
<b>Figura 4.28.</b> Variação da microestrutura das emulsões A/A com o tempo. Barra = 100 μm.....	86
<b>Figura 4.29.</b> Comportamento reológico de emulsões A/A. A) Curvas de escoamento e B) variação do módulo complexo ( $G^*$ ) com o tempo: (×) FS, (○) FI, (—) FS1FI3, (□) FS2FI2 e (✱) FS3FI1.....	87
<b>Figura 4.30.</b> Microestrutura das soluções formadas pela mistura de uma das fases separadas da solução 4 % (m/v) Na-CN e 0,4 % (m/v) LBG com uma emulsão O/A estabilizada por caseinato de sódio e homogeneizada a 600 bar. Barras da escala: 50 μm (para aumento de 200x) e 20 μm (para aumento de 500x). ....	89
<b>Figura 4.31.</b> Microestrutura das emulsões múltiplas formadas pela mistura de uma solução mista de fases separadas (FS1FI3, FS2FI2 e FS3FI1) com uma emulsão O/A estabilizada por caseinato de sódio e homogeneizada a 600 bar. Barras da escala: 50 μm (para aumento de 200x) e 20 μm (para aumento de 500x). ....	90

## NOMENCLATURA / ABREVIações

LBG	Goma jataí
Na-CN	Caseinato de sódio
GDL	Glucono- $\delta$ -lactona
O/A	Emulsão óleo – água
A/A	Emulsão água – água
O/A/A	Emulsão múltipla do tipo óleo-água-água
H	Altura da fase inferior das emulsões
H <sub>0</sub>	Altura inicial das emulsões
d <sub>32</sub>	Diâmetro médio superficial das gotas ( $\mu\text{m}$ )
pI	ponto isoelétrico da proteína
VR <sub>teórica</sub>	Razão de volumes teórica
VR <sub>exp</sub>	Razão de volumes experimental
FS	Fase superior de uma solução de fases separadas composta por 4% (m/v) Na-CN e 0,4% (m/v) LBG
FI	Fase inferior de uma solução de fases separadas composta por 4% (m/v) Na-CN e 0,4% (m/v) LBG
$\sigma$	Tensão (Pa)
$\dot{\gamma}$	Taxa de deformação ( $\text{s}^{-1}$ )
F	Força (N)
$\eta$	Viscosidade (Pa.s)
$\eta_{100}$	Viscosidade aparente à taxa de deformação de $100 \text{ s}^{-1}$ (Pa.s)
k	Índice de consistência ( $\text{Pa.s}^n$ )
n	Índice de comportamento
$\sigma_0$	Tensão residual (Pa)
G*	Módulo complexo (Pa)
G'	Módulo elástico ou de armazenamento (Pa)
G''	Módulo viscoso ou de dissipação de energia (Pa)



## **Dissertação de mestrado**

**AUTORA: Fabiana de Assis Perrechil**

**TÍTULO: Avaliação estrutural e reológica de emulsões simples e múltiplas estabilizadas por caseinato de sódio e jataí**

**ORIENTADORA: Profa. Dra. Rosiane Lopes da Cunha**

**Depto. Engenharia de Alimentos – FEA – UNICAMP**

### **RESUMO GERAL**

Proteínas e polissacarídeos são amplamente utilizados em emulsões alimentícias como agentes emulsificantes e estabilizantes. Entretanto, a presença de ambos biopolímeros em solução aquosa pode resultar no processo de separação de fases, dependendo das condições de pH e força iônica empregadas. Esse estudo mostrou que é possível a produção de diferentes tipos de emulsões múltiplas através da mistura de emulsões óleo-água (O/A) com uma mistura de biopolímeros de fases separadas. Inicialmente, foram estudadas as propriedades de emulsões óleo-água (O/A) estabilizadas por caseinato de sódio (Na-CN) sob diferentes condições de acidificação e aplicação de pressão, além das emulsões estabilizadas por Na-CN e goma jataí (LBG). A maioria das emulsões apresentou separação de fases devido ao mecanismo de cremação, porém este processo de desestabilização foi reduzido quando existiu o aumento da viscosidade dos sistemas ou a diminuição do tamanho das gotas. A viscosidade das emulsões foi modificada pela adição de maiores concentrações de óleo e biopolímeros, e pela redução do pH em direção ao ponto isoelétrico da proteína. Já a redução do tamanho das gotas foi realizada através de aplicação de altas pressões. A homogeneização a altas pressões promoveu a formação de emulsões com tamanhos de gotas muito reduzidos (entre 0,39 e 1,50  $\mu\text{m}$ ), sendo possível a sua utilização para o preparo das emulsões múltiplas. Em uma segunda etapa do trabalho, um diagrama de fases foi construído para identificar a faixa de concentrações de Na-CN e LBG que resultariam em uma solução de fases separadas, bem como as condições de pH e força iônica necessárias para o processo de separação de fases. Assim, as soluções mistas Na-CN – LBG formaram uma fase inferior rica em Na-CN ( $A_1$ ) e uma fase superior rica em LBG ( $A_2$ ), sendo possível a formação de emulsões água-água ( $A_1/A_2$  ou  $A_2/A_1$ ) através da mistura das fases superior e inferior em diferentes razões. A mistura de uma emulsão O/A estabilizada por Na-CN e homogeneizada a alta pressão, com soluções de fases separadas compostas pelas mesmas razões de fase superior e

inferior utilizadas no preparo das emulsões A/A resultou na formação de emulsões múltiplas. Estas emulsões foram do tipo óleo-água-água ( $O/A_1/A_2$ ) ou do tipo óleo-água/água-água ( $O/A_1-A_2/A_1$ ), dependendo da composição inicial de biopolímeros no sistema.

## **Master Degree Thesis**

**AUTHOR: Fabiana de Assis Perrechil**

**TITLE: Structural and rheological evaluation of simple and multiple emulsions stabilized by sodium caseinate and LBG**

**SUPERVISOR: Profa. Dra. Rosiane Lopes da Cunha**

**Depto. Engenharia de Alimentos – FEA – UNICAMP**

### **ABSTRACT**

Proteins and polysaccharides are widely used in food emulsions as emulsifying and stabilizing agents. However, the mixture of both biopolymers in an aqueous solution can lead to a phase separation process, depending on the conditions of pH and ionic strength. This study showed that multiple emulsions can be prepared by mixing an oil-in-water (O/W) emulsion with a mixed biopolymer solution that separates into two phases. Initially, the oil-in-water emulsions (O/W) stabilized by sodium caseinate were studied at different conditions of acidification and high-pressure homogenization. Emulsions stabilized by Na-CN and LBG were also studied. Most of the emulsions showed phase separation due to the creaming mechanism, but this destabilization process was reduced with the increase of system viscosity and the decrease of oil droplet size. The emulsion viscosity was changed by addition of greater oil and biopolymer concentrations and by reduction of pH in direction to protein's isoelectric point, while reduction of droplet size was obtained by application of high pressure. The high-pressure homogenization promoted the formation of very small droplets (between 0.39 and 1.5  $\mu\text{m}$ ), which favored the production of multiple emulsions. In a second step of this work, a phase diagram was constructed to identify the range of sodium caseinate (Na-CN) and locust bean gum (LBG) concentrations where phase separation occurred and the conditions of pH and ionic strength that led to the incompatibility between them. Thus, in this conditions, the Na-CN – LBG mixed solution formed a two-phase system consisting of a Na-CN – enriched lower phase ( $W_1$ ) and a LBG – enriched upper phase ( $W_2$ ). Water-in-water emulsions ( $W_1/W_2$  or  $W_2/W_1$ ) could be formed by blending incompatible upper and lower phases together at different ratios. Thus, multiple emulsions were prepared by mixing the O/W emulsions homogenized at high-pressure with the same incompatible solutions used to prepare the W/W emulsions. The produced multiple emulsions were the oil-in-water-in-

water ( $O/W_1/W_2$ ) type or the mixed oil-in-water/water-in-water ( $O/W_1 - W_2/W_1$ ) type depending on the initial biopolymer composition of the system.



## **CAPÍTULO 1. Introdução e objetivos**



## 1.1. INTRODUÇÃO

Uma ampla variedade de produtos alimentícios é constituída parcial ou integralmente por emulsões óleo-água (O/A) ou água-óleo (A/O). Exemplos de emulsões alimentícias O/A são o leite, iogurte, molho para salada, maionese e sorvete, enquanto a margarina e a manteiga são exemplos de emulsões A/O. A enorme diversidade de características sensoriais e físico-químicas apresentadas por estes produtos é resultado dos diferentes tipos de ingredientes e condições de processamento utilizadas, porém deve-se considerar que são sistemas altamente instáveis e alguns componentes macromoleculares devem ser utilizados para minimizar este problema de qualidade. Proteínas e polissacarídeos são os biopolímeros funcionais mais importantes utilizados como ingredientes em emulsões (DICKINSON, 2003), pois possuem habilidade para controlar a textura, estrutura, e estabilidade destes produtos alimentícios.

Proteínas podem ser usadas como emulsificantes em alimentos devido à sua habilidade de facilitar a formação, melhorar a estabilidade, além de fornecer propriedades físico-químicas desejáveis para as emulsões (DICKINSON, 2003; MCCLEMENTS, 2005). Derivados de proteína, como o caseinato de sódio, também são usados como ingredientes tecnologicamente funcionais em emulsões. Já os polissacarídeos são usualmente adicionados à fase aquosa como agente espessante, a fim de modificar o comportamento reológico da fase aquosa e, então, retardar os mecanismos de instabilidade (DICKINSON, 2003). A jataí ou locuste (LBG) é um polissacarídeo neutro que é largamente usado na indústria de alimentos como espessante, estabilizante e agente de retenção de água.

Entretanto, misturas de proteínas e polissacarídeos são usualmente incompatíveis quando presentes em soluções aquosas sob determinadas condições de pH, força iônica e concentração, resultando na formação de duas fases, sendo cada uma delas rica em um dos biopolímeros. As fases formadas podem ser misturadas pela aplicação de forças cisalhantes para formar emulsões água-água (A/A), que consistem em gotas de uma solução aquosa dispersas em uma fase contínua aquosa. As emulsões A/A são termodinamicamente instáveis como as emulsões óleo-água (O/A) e também tendem à desestabilização com o tempo. A mistura das emulsões água-água com as tradicionais contendo óleo (O/A) resulta no desenvolvimento de emulsões duplas ou múltiplas, como por exemplo, emulsões água-óleo-água (A/O/A), óleo-água-óleo (O/A/O) ou óleo-água-água (O/A/A) (DICKINSON &

MCCLEMENTS, 1995; GARTI & BENICHO, 2004), as quais podem apresentar diferentes propriedades em função da escolha do biopolímero presente na fase contínua.

As emulsões múltiplas apresentam diversas vantagens em relação às emulsões convencionais presentes em produtos alimentícios, entre elas a produção de alimentos com propriedades sensoriais e físico-químicas similares às emulsões O/A, mas com níveis reduzidos de gordura (MALONE *et al.*, 2003). Além disso, essas emulsões podem ser usadas como sistemas transportadores com liberação controlada de agentes ativos, tais como aromas, agentes antimicrobianos ou lipídios bioativos (LIAN *et al.*, 2004; MALONE & APPELQVIST, 2003).

Assim, com o intuito de obter emulsões de alimentos que tenham estruturas diferenciadas e desejáveis, é necessário, primeiramente, entender e monitorar as mudanças que ocorrem nas interações entre os ingredientes e consequências do processo na reologia e microestrutura do produto final e durante sua estocagem.

## **1.2. OBJETIVOS**

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a influência do caseinato de sódio (Na-CN) e da goma jataí (LBG) em sistemas mistos aquosos como emulsificantes / estabilizantes de emulsões A/A, O/A e emulsões múltiplas.

Os objetivos específicos foram:

1. Determinação das condições de separação de fases entre o caseinato de sódio e a goma jataí em sistemas aquosos resultando na construção de um diagrama de fases;
2. Obtenção de emulsões água-água (A/A) a partir de uma solução Na-CN – LBG de fases separadas e avaliação da estabilidade, estrutura e comportamento reológico dessas emulsões;
3. Preparo de emulsões óleo-água (O/A) estabilizadas por caseinato de sódio e jataí e verificação da influência da concentração dos ingredientes, variação do pH e homogeneização na estabilidade, estrutura e reologia desses sistemas;
4. Produção de emulsões múltiplas O/A/A e avaliação da estrutura.

## **CAPÍTULO 2. Revisão Bibliográfica**



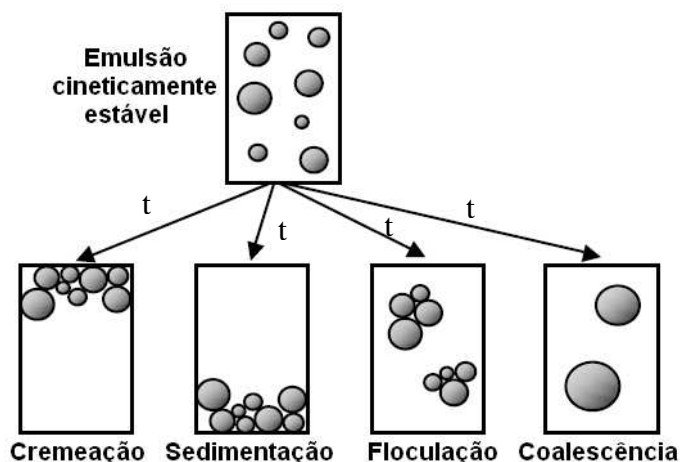
## 2.1. EMULSÕES

Uma emulsão é composta por dois líquidos imiscíveis (usualmente óleo e água), com um dos líquidos disperso no outro na forma de pequenas gotas esféricas. A substância ou solução que compõe as gotas é chamada de fase dispersa, enquanto que aquela que compõe o meio é chamada de fase contínua (MCCLEMENTS, 2005). As emulsões podem ser classificadas de acordo com a distribuição relativa das diferentes fases. Um sistema formado por gotas de óleo dispersas em uma fase contínua aquosa é chamado emulsão óleo em água (O/A), como é o caso do leite, maionese, sopas e molhos; enquanto que um sistema formado por gotas de água dispersas em uma fase oleosa é chamado emulsão água em óleo (A/O), tendo como exemplos a margarina e a manteiga.

O processo de formação de emulsões consiste na mistura de dois líquidos imiscíveis através de uma etapa de homogeneização, a qual pode ser dividida em duas categorias: homogeneização primária e secundária. A homogeneização primária é definida como a produção de uma emulsão diretamente a partir de dois líquidos imiscíveis, enquanto que a homogeneização secundária consiste na redução dos tamanhos de gotas já existentes em uma emulsão. Dependendo do produto desejado, deve-se utilizar uma dessas categorias de homogeneização ou uma combinação das duas, como por exemplo, no preparo de molhos de salada usualmente utiliza-se a homogeneização primária para a mistura das fases oleosas e aquosas, enquanto que na produção de leite utiliza-se a homogeneização secundária para a redução dos glóbulos de gordura já existentes. Esta etapa do processamento de emulsões é muito importante para definir algumas propriedades físico-químicas e organolépticas, tais como, textura, sabor, aparência e estabilidade (MCCLEMENTS, 2005).

Todas as emulsões são termodinamicamente instáveis e tendem a se romper com o tempo, resultando em duas fases líquidas separadas. Particularmente para emulsões O/A existem diversos mecanismos de desestabilização, sendo os principais a cremação gravitacional, sedimentação, floculação e coalescência das gotas (DICKINSON, 1992) (Figura 2.1). A floculação é um processo no qual as gotas emulsificadas se associam em flocos sem a destruição das gotas individuais. Quando as paredes das gotas são destruídas e existe a formação de gotas maiores, trata-se do processo conhecido como coalescência. A cremação ocorre quando a fase dispersa é menos densa do que a fase contínua, porém não existe

coalescência. Já na sedimentação, as gotas são mais densas do que o meio contínuo (HILL, 1996).



**Figura 2.1.** Representação esquemática dos mecanismos de instabilidade das emulsões O/A. Fonte: McClements (2005).

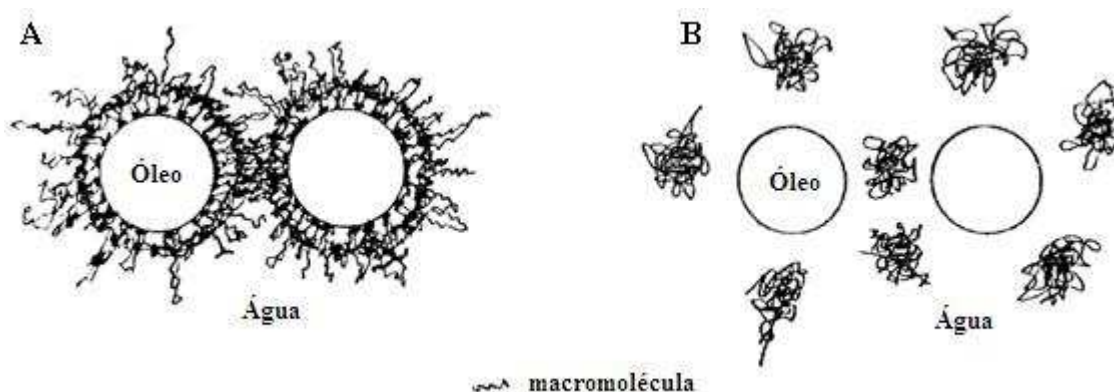
No entanto, existe uma distinção entre estabilidade termodinâmica e estabilidade cinética (DICKINSON, 1992), sendo que a primeira indica se processo poderá ou não ocorrer, enquanto que o segundo informa a taxa no qual o processo ocorrerá (ATKINS, 1994). Como todas as emulsões são termodinamicamente instáveis, informações sobre a estabilidade cinética são importantes para o desenvolvimento de produtos que apresentem propriedades desejáveis por um período de tempo suficientemente longo. Desta maneira, para produzir emulsões cineticamente estáveis é necessária a adição de dois tipos de ingredientes: emulsificantes e estabilizantes (DICKINSON, 1992).

Emulsificantes são espécies químicas (ou misturas de espécies) que promovem a formação da emulsão e estabilização por ação interfacial (Figura 2.2 A). Existem duas grandes classes de emulsificantes usadas no processamento de alimentos: surfactantes de baixa massa molar (monoglicerídeos, polissorbatos, lecitina, etc) e emulsificantes macromoleculares (usualmente proteínas, principalmente do leite e do ovo) (DICKINSON, 2003). Emulsificantes de baixa massa molar são bastante utilizados no preparo de emulsões devido a sua atividade superficial. Entretanto, muitas dessas moléculas podem causar malefícios à saúde dos consumidores, podendo ser utilizadas apenas em níveis limitados (poucos miligramas por quilograma corporal por dia) ou são restritas para determinados alimentos. Apenas poucos emulsificantes, tais como lecitina ou mono-diglicerídeos, são geralmente reconhecidos como



seguros (“generally recognized as safe” – GRAS) e podem ser utilizados sem qualquer limitação (GARTI & LESER, 2001). Neste contexto, as proteínas surgem como alternativa, já que o seu uso como aditivo alimentício ou como ingrediente em alimentos é permitido sem restrições.

Já os estabilizantes atuam de maneira diferente dos emulsificantes, não apresentando atividade superficial (Figura 2.2B), como é o caso da maior parte dos polissacarídeos. São compostos que podem oferecer estabilidade a longo prazo para uma emulsão (DICKINSON, 1992), atuando através de dois possíveis mecanismos: (1) via modificação da viscosidade ou (2) gelificação da fase contínua aquosa (Figura 2.2 B) (DICKINSON, 2003).



**Figura 2.2.** Ilustração esquemática de gotas de óleo em água estabilizadas por (A) moléculas anfifílicas adsorvidas na interface óleo-água (ex. proteínas) e (B) macromoléculas não adsorvidas atuando na modificação da viscosidade da fase contínua (ex. polissacarídeos). Fonte: Garti e Leser (2001).

Entretanto, a presença de biopolímeros na fase aquosa das emulsões O/A pode influenciar a estabilidade dos sistemas através de uma variedade de mecanismos (DICKINSON, 2003). Um desses mecanismos de desestabilização é a floculação por depleção. Neste caso, a presença de biopolímeros não-adsorvidos na fase aquosa das emulsões causa um aumento nas forças atrativas entre as gotas devido a um efeito osmótico associado com a exclusão dos biopolímeros da estreita região entre as gotas (WALSTRA, 2003; MCCLEMENTS, 2000). Essa força se torna maior com o aumento da concentração dos biopolímeros, até eventualmente se tornar maior do que as forças repulsivas e causar então a floculação.

## 2.2. BIOPOLÍMEROS

### 2.2.1. Caseínas

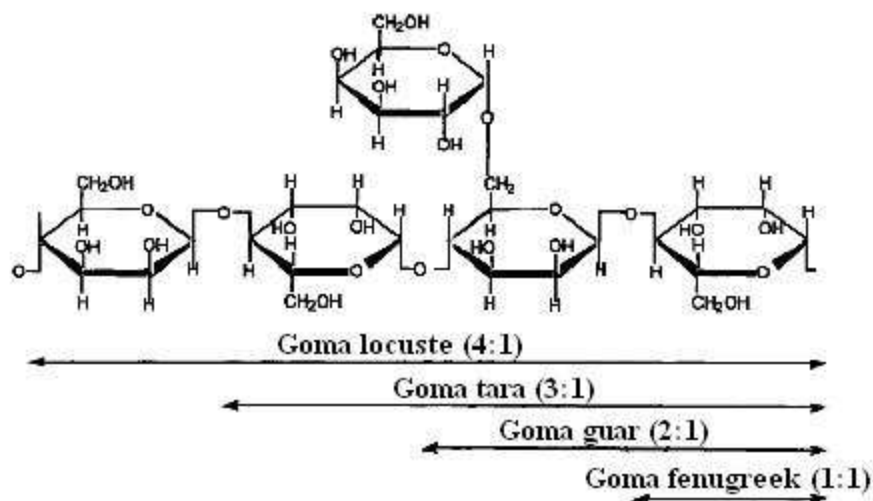
As proteínas apresentam algumas propriedades funcionais importantes tais como espumantes, emulsificantes e gelificantes, sendo muito utilizadas na formulação de produtos alimentícios (SGARBIERI, 1996). Em especial, as propriedades emulsificantes das proteínas são resultado da sua capacidade de redução da tensão interfacial através da sua adsorção na interface óleo-água e da sua habilidade de formação de filmes através de uma combinação de interações eletrostáticas e estéricas (MCCLEMENTS, 2005). O caseinato de sódio é um sal derivado da caseína amplamente utilizado em produtos alimentícios como substituto de leite em queijos análogos e como agente emulsificante. Este ingrediente apresenta uma boa propriedade emulsificante quando comparada com outras proteínas por possui uma elevada solubilidade, uma estrutura naturalmente dissociada e desdobrada, além de uma hidrofobicidade global relativamente elevada, com uma nítida separação entre as zonas muito hidrofílicas e muito hidrofóbicas das cadeias polipeptídicas (CHEFTEL et al., 1996). O caseinato de sódio é composto pela mistura de quatro subunidades individuais da caseína ( $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - e  $\kappa$ -) que, em solução aquosa, formam complexos e agregados com pesos moleculares variados. No entanto, este ingrediente apresenta uma limitada aplicabilidade para o uso em emulsões acidificadas. A gradual acidificação para valores de pH próximos ao ponto isoeletrico da proteína ( $\approx 4,6$ ) aumenta as forças atrativas entre as moléculas de caseína, resultando em uma conseqüente auto-associação dos componentes protéicos adsorvidos e não-adsorvidos (ALLEN et al., 2006) levando a uma desestabilização da emulsão.

### 2.2.2. Galactomananas

Os polissacarídeos são ingredientes predominantemente hidrofílicos e que não apresentam atividade superficial particular (DICKINSON, 2003), salvo algumas exceções como a goma arábica. Em geral, são adicionados às emulsões O/A como agente espessante, de modo a produzir características de textura desejáveis e para retardar os mecanismos de instabilidade (DICKINSON, 2003; MCCLEMENTS, 2000). As galactomananas são polissacarídeos provenientes de leguminosas, vastamente utilizados na indústria de alimentos devido às suas propriedades espessantes e estabilizantes. Sua estrutura é formada por uma cadeia linear de unidades de D-manose unidas através de ligações  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) com diferentes

quantidades de substituintes D-galactose ligados através de ligações glicosídicas  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 6). Dependendo da fonte de extração, estes polissacarídeos podem apresentar diferentes características químicas, como a variação no grau de substituição de galactose. Assim, gomas com razão galactose/manose de 1:4, 1:3, 1:2 e 1:1 são chamadas de goma jataí ou locuste (LBG), goma tara, guar e “fenugreek”, respectivamente (Figura 2.3) (WIELINGA & MAEHALL, 2000).

A LBG, em especial, apresenta uma ampla variedade de aplicações industriais, sendo utilizada em emulsões devido à sua habilidade de formar soluções muito viscosas em concentrações relativamente baixas. É relativamente estável a variações do pH, força iônica e temperatura, principalmente devido ao seu caráter neutro (GLICKSMAN, 1969). No entanto, a estabilidade e textura de sistemas alimentícios coloidais depende, não apenas das propriedades funcionais dos ingredientes individuais, mas também da natureza e força das interações entre os componentes, especialmente os macromoleculares, como proteínas e polissacarídeos (DICKINSON, 1992).



**Figura 2.3.** Ilustração esquemática da estrutura da LBG, goma tara, goma guar e “fenugreek”. Fonte: Gardi e Lesser (2001).

### 2.3. INTERAÇÕES PROTEÍNAS - POLISSACARÍDEOS

Proteínas e polissacarídeos desempenham um papel muito importante na estrutura e estabilidade de muitos alimentos processados. A mistura destes dois biopolímeros em solução aquosa pode resultar em diversos tipos de estruturas, dependendo do tipo de interação

existente entre eles. As interações podem ser associativas ou segregativas, resultando em três possíveis situações:

- **miscibilidade:** o sistema permanece homogêneo, não existindo separação de fases. Neste caso, os diferentes biopolímeros agem como se fossem hidrocolóides do mesmo tipo. De acordo com o segundo princípio da termodinâmica, a mistura de um ou mais componentes com um solvente é possível se o resultado da energia livre da mistura ( $\Delta G_{\text{mist}}$ ) é negativo, e  $\Delta G_{\text{mist}} = \Delta H_{\text{mist}} - T\Delta S_{\text{mist}}$ , onde  $\Delta H_{\text{mist}}$  e  $\Delta S_{\text{mist}}$  são entalpia e entropia da mistura, respectivamente, e T é a temperatura absoluta em K. Assim, a mistura de biopolímeros é estável quando a entropia da mistura é elevada, já que a energia livre é negativamente favorecida (SCHIMITT et al., 1998). Este tipo de situação geralmente ocorre para soluções diluídas.

- **incompatibilidade:** ocorre segregação dos biopolímeros com a formação de duas fases aquosas imiscíveis, sendo cada uma delas rica em um dos biopolímeros. Esse mecanismo geralmente ocorre quando existe o aumento na concentração dos biopolímeros ou a agregação de um deles, pois as moléculas tendem a um estado mais organizado na solução, influenciando negativamente a entropia da mistura e levando a valores positivos de energia livre da mistura.

- **coacervação complexa:** existe atração entre os diferentes biopolímeros resultando na formação de duas fases aquosas, sendo uma delas rica nos dois biopolímeros e a outra formada predominantemente pelo solvente. Este tipo de processo geralmente ocorre em uma mistura quando as proteínas e polissacarídeos possuem cargas opostas, o que favorece as interações moleculares entre estes biopolímeros. Desta maneira, o processo de coacervação é governado pela contribuição entálpica da energia livre da mistura (DE KRUIF & TUINIER, 2001).

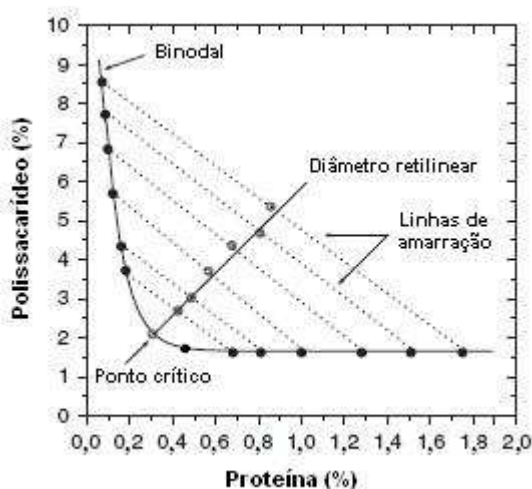
A situação de incompatibilidade termodinâmica, em especial, pode ocorrer para qualquer sistema proteína-polissacarídeo-água dependendo das condições do meio aquoso, como concentração de biopolímeros, pH e força iônica (BRYANT & MCCLEMENTS, 2000; LANEUVILLE et al., 2000; SPAGNUOLO et al., 2005). Essas condições necessárias para a separação de fases variam de acordo com os biopolímeros presentes no sistema (GRINBERG & TOLSTOGUZOV, 1997). Em relação à concentração dos biopolímeros, tem-se que o principal fator que determina o limiar da separação de fases é o volume de exclusão (TOLSTOGUZOV, 2000). Considera-se que o volume de uma solução ocupada por uma macromolécula não está acessível para outras macromoléculas. Desta forma, existe um

aumento da limitação espacial quando ocorre a transição de uma solução diluída para uma solução semi-diluída. Isso ocorre, pois nas soluções diluídas, as macromoléculas individuais não estão em contato umas com as outras, enquanto que nas soluções semi-diluídas, as moléculas interagem e competem pelo mesmo espaço (TOLSTOGUZOV, 2000). Assim, a separação de fases geralmente ocorre quando a concentração total de biopolímeros excede um certo valor crítico que corresponde ao regime de soluções semi-diluídas.

Em relação ao pH e força iônica, tem-se um aumento da auto-associação das moléculas de proteínas conforme o pH se aproxima do pI das proteínas, ou então na presença de altas concentrações de sais (GRINBERG & TOLSTOGUZOV, 1997; TOLSTOGUZOV, 2000). A diminuição do pH resulta em uma gradual diminuição das forças repulsivas eletrostáticas entre as moléculas de proteína, resultando em uma associação das mesmas. Já a influência da adição de sal na compatibilidade dos sistemas pode ser explicada através dos efeitos de “salting in” e “salting out”. Em baixas concentrações de sal (ou baixa força iônica), os íons dos sais interagem com as cargas das proteínas, resultando em um aumento da solubilidade das mesmas (“salting in”). Entretanto, quando são adicionadas maiores concentrações de sal, existe uma diminuição da solubilidade protéica (“salting out”) devido a uma competição entre a proteína e os íons de sal pelas moléculas de água, fazendo que a água se torne um mau solvente para a proteína e resultando em uma auto-associação das mesmas (CHEFTEL *et al.*, 1996). Assim, geralmente espera-se que exista um aumento da incompatibilidade entre proteínas e polissacarídeos, à medida que a força iônica aumenta e o pH se aproxima do pI das proteínas.

Diagramas de fases podem ser construídos para descrever as interações entre cada par de biopolímeros. Convencionalmente, os diagramas de fases de sistemas ternários são apresentados em coordenadas triangulares. Entretanto, como nestes sistemas existe um excesso de solvente em relação aos biopolímeros, torna-se mais fácil a construção de diagramas de fases em coordenadas retangulares. A Figura 2.4 apresenta um diagrama de fases típico construído para uma solução mista de biopolímeros em coordenadas retangulares. Nesse diagrama, o eixo horizontal corresponde à concentração de proteína, enquanto que o eixo vertical corresponde à concentração de polissacarídeo. Cada ponto do diagrama de fases corresponde à composição de um sistema, sendo que a curva binodal separa as regiões monofásica (abaixo da curva) e bifásica (acima da curva). As linhas de amarração conectam os

pontos correspondentes às composições das fases em equilíbrio e o diâmetro retilinear passa através do ponto médio das linhas de amarração. Já o ponto crítico representa a composição de um sistema que se separa em duas fases de mesmo volume e composição (TOLSTOGUZOV, 2000).



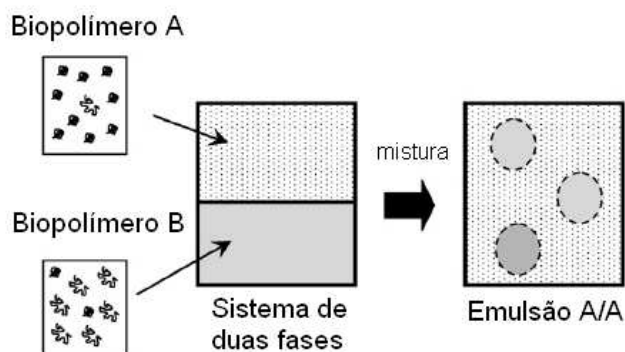
**Figura 2.4.** Diagrama de fases típico em coordenadas retangulares para uma solução mista proteína-polissacarídeo. Fonte: Adaptado de Musampa et al. (2007).

A construção dos diagramas de fases geralmente se inicia com o preparo de uma série de soluções mistas proteína-polissacarídeo suficientemente diferentes em relação à concentração de biopolímeros. A centrifugação destes sistemas irá então fornecer informações a respeito da compatibilidade (formação de uma ou duas fases) e da razão de volume das fases dos sistemas (TOLSTOGUZOV, 2000). A quantidade de cada biopolímero em cada uma das fases pode ser mensurada através de diversas técnicas. O método de Kjeldahl é bastante aplicado para a medida da quantidade de proteína, enquanto que a concentração de polissacarídeo é usualmente determinada pelo método Fenol-Sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). A partir da composição de cada fase, pode-se construir as linhas de amarração e, em seguida, a curva binodal. O cruzamento entre a binodal e o diâmetro retilinear, o qual passa pelo ponto médio das linhas de amarração, define o ponto crítico dos diagramas (TOLSTOGUZOV, 2000; ANTONOV et al., 1999, POLYAKOV et al., 1980).

A partir da determinação das condições do meio (pH e força iônica) e concentrações dos biopolímeros (diagramas de fases) que resultam na incompatibilidade dos sistemas mistos, é possível produzir as emulsões água-água (A/A) e emulsões múltiplas (O/A/A).

## 2.4. EMULSÕES ÁGUA-ÁGUA (A/A)

Sistemas mistos de proteínas e polissacarídeos que apresentam separação de fases podem ser utilizados para o preparo de emulsões água-água (A/A). Este tipo de emulsão é preparado pela mistura das fases separadas com a aplicação de forças cisalhantes (Figura 2.5). Desta maneira, são formadas gotas aquosas dispersas em uma fase contínua também aquosa, não existindo a presença de óleo no sistema (NORTON & FRITH, 2001).



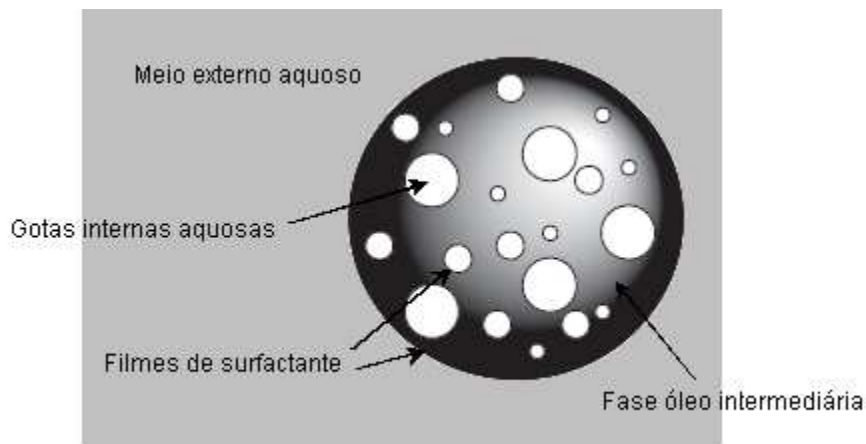
**Figura 2.5.** Representação esquemática da produção de uma emulsão água-água (A/A) a partir de uma solução aquosa de fases separadas. Fonte: McClements (2006).

As emulsões A/A apresentam diferentes propriedades em relação às aquelas que contêm óleo, principalmente em relação às propriedades da interface (SCHOLTEN *et al.*, 2006). As propriedades específicas das emulsões A/A são: (i) equilíbrio entre as fases; (ii) baixa tensão interfacial, (iii) interface com baixa densidade e viscosidade, (iv) interface de alta deformabilidade e fácil coalescência das partículas dispersas e (v) adsorção de partículas lipídicas entre as fases aquosas (TOLSTOGUZOV, 2004). Estas emulsões podem ser aplicadas em diversos produtos, principalmente para encapsulação de compostos e desenvolvimento de texturas diferenciadas para produtos farmacêuticos, alimentícios ou cosméticos (SAGIS, 2007).

O comportamento de misturas de fases separadas compostas por proteínas e polissacarídeos tem recebido bastante atenção na última década, sendo os principais trabalhos realizados por Tolstoguzov e outros autores (POLYAKOV *et al.*, 1980; GRINBERG & TOLSTOGUZOV, 1997; TOLSTOGUZOV, 2003). A maioria das misturas estudadas usou gelatina ou proteínas do leite como fonte de proteína, porém apenas um trabalho utilizou a mistura de proteína do leite (caseína) com LBG (BOURRIOT *et al.*, 1999).

## 2.5. EMULSÕES MÚLTIPLAS

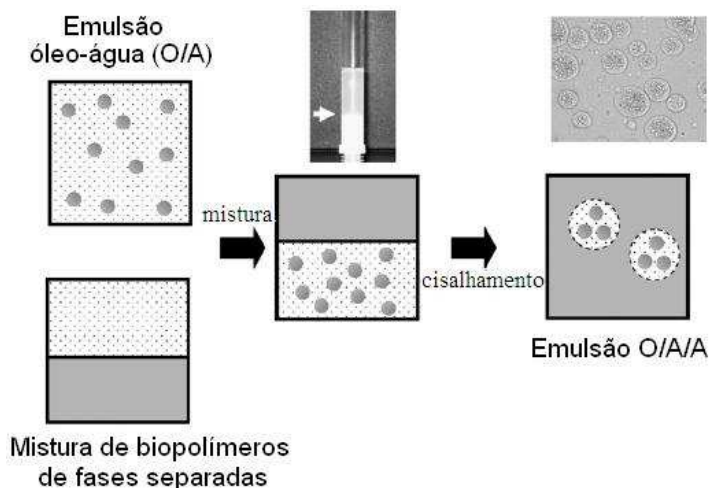
Além das emulsões simples O/A, A/O ou A/A, é possível também a obtenção de emulsões múltiplas do tipo óleo-água-óleo (O/A/O), água-óleo-água (A/O/A) ou óleo-água-água (O/A/A) (GARTI, 1997; GARTI & BENICHO, 2004). Emulsões A/O/A, por exemplo, consistem em pequenas gotas de água dispersas em gotas maiores de óleo, as quais estão dispersas em uma fase contínua aquosa (Figura 2.6).



**Figura 2.6.** Representação esquemática de uma emulsão múltipla A/O/A. Fonte: Garti e Benichou (2004).

Recentemente alguns pesquisadores mostraram que é possível preparar diferentes tipos de emulsões múltiplas baseadas na incompatibilidade termodinâmica de soluções mistas de biopolímeros. Emulsões óleo-água-água (O/A/A), por exemplo, podem ser preparadas pela mistura de uma emulsão O/A com uma solução de biopolímeros de fases separadas (Figura 2.7) (LIAN et al., 2004, NORTON & FRITH, 2001). Esse tipo de emulsão também pode apresentar diversas vantagens em relação às emulsões convencionais. Emulsões O/A/A podem ser utilizadas para produzir sistemas alimentícios com propriedades físico-químicas e sensoriais similares às emulsões O/A, porém com níveis reduzidos de gordura (MALONE et al., 2003). Alternativamente, emulsões O/A/A podem ser usadas como sistemas de transporte para a liberação de agentes ativos, tais como aromas, antimicrobianos ou lipídeos bioativos (LIAN et al., 2004, MALONE & APPELQVIST, 2003). No entanto, o principal problema relacionado com a aplicação das emulsões múltiplas é a enorme instabilidade destes sistemas, existindo uma forte tendência para coalescência, floculação e cremação (GARTI & BENICHO, 2004).





**Figura 2.7.** Representação esquemática da produção de uma emulsão óleo-água-água (O/A/A) a partir de um sistema de fases separadas. Fonte: McClements (2006).

A grande maioria dos trabalhos encontrados na literatura apresentam o estudo de emulsões A/O/A ou O/A/O. Benichou *et al.* (2007), por exemplo, apresentaram o estudo de emulsões A/O/A estabilizadas por complexos de proteínas do soro (WPI) com polissacarídeos. Neste caso, uma emulsão A/O primária foi misturada com uma solução aquosa, resultando na formação de emulsões A/O/A. No entanto, foi encontrado apenas um trabalho onde foram formadas emulsões O/A/A (KIM *et al.*, 2006). Neste último caso, Kim *et al.* (2006) estudaram a formação de emulsões múltiplas do tipo O/A/A a partir da mistura de uma emulsão O/A estabilizada por proteínas do soro desnaturadas (HD-WPI), com uma solução de fases separadas composta por pectina e HD-WPI.

## 2.6. REOLOGIA DE EMULSÕES

A reologia é a ciência que estuda a deformação e o escoamento dos materiais, sendo a maioria dos ensaios reológicos baseados na aplicação de uma força e na medida do escoamento ou deformação resultante (MCCLEMENTS, 2005). O conhecimento das propriedades reológicas em emulsões é muito importante por diversos motivos. A eficiência de ruptura das gotas em um homogeneizador e a vida de prateleira de emulsões alimentícias, por exemplo, dependem da viscosidade dos componentes individuais. Além disso, informações sobre a reologia de emulsões são utilizadas pelos engenheiros de alimentos para o dimensionamento de operações que dependam do modo como o produto escoar, por

exemplo, escoamento através de uma tubulação, agitação, passagem através de um trocador de calor e embalagem em recipientes (MCKENNA & LYNG, 2003). Muitos dos atributos sensoriais também estão diretamente relacionados com as propriedades reológicas como, por exemplo, cremosidade, espalhabilidade e dureza. Finalmente, as medidas reológicas são freqüentemente utilizadas como uma ferramenta analítica para fornecer informações fundamentais sobre a organização estrutural e interações entre os componentes em emulsões (MCCLEMENTS, 2005).

Emulsões alimentícias são materiais estruturalmente complexos que podem exibir diferentes comportamentos reológicos, variando desde fluidos de baixa viscosidade (ex: leite), géis viscoelásticos (ex. iogurtes), até sólidos bastante duros (ex. manteiga sob refrigeração). Entretanto, apesar da diversidade de comportamentos reológicos exibidos pelas emulsões alimentícias, é possível caracterizar seu comportamento reológico a partir de poucos modelos simples: sólidos, líquidos e plásticos (RAO, 1999). Assim, sistemas muito complexos podem então ser descritos pela combinação de dois ou mais desses modelos simples (MCCLEMENTS, 2005).

### 2.6.1. Sólidos

Um sólido elástico ideal é freqüentemente chamado de Hookeano, pois Robert Hooke foi o cientista que primeiro observou a relação linear entre a força aplicada a um material e a conseqüente deformação do mesmo (MCCLEMENTS, 2005). Além disso, esse tipo de material apresenta a propriedade de voltar ao tamanho e forma iniciais quando a força é retirada. A lei de Hooke é representada pela equação (1), onde a força por unidade de área (tensão) que atua no material é proporcional à deformação relativa (ou deformação) do material. Esta relação é aplicada apenas para materiais elásticos em relativamente baixas deformações.

$$\sigma = E \cdot \gamma \quad (1)$$

onde  $\sigma$  é a tensão,  $E$  é uma constante e  $\gamma$  é a deformação.

Entretanto, o comportamento reológico em altas deformações é bastante relevante aos processos como corte ou mastigação (VAN VLIET, 1995), sendo essencial a caracterização das propriedades reológicas dos sólidos sob essas condições. Como a lei de Hooke não é

válida para altas deformações, um módulo aparente (tensão / deformação) pode ser definido para cada valor particular de deformação (MCCLEMENTS, 2005).

### 2.6.2. Líquidos

Os líquidos ideais são chamados de Newtonianos e apresentam a propriedade de escoar quando uma tensão de cisalhamento é aplicada. Quando essa tensão é retirada, o líquido continua escoando até que a energia aplicada seja dissipada na forma de calor (MCCLEMENTS, 2005). A viscosidade destes materiais é uma medida da sua resistência ao escoamento, ou seja, quanto mais alta a viscosidade, maior é a resistência ao escoamento (MACOSKO, 1994). Como a tensão aplicada ao fluido é igual à força dividida pela área sobre a qual está agindo ( $\sigma = F/A$ ), e a taxa de deformação é dada pelo deslocamento das camadas por unidade de tempo ( $\dot{\gamma} = \frac{d\gamma}{dt}$ ), tem-se a seguinte relação:

$$\sigma = \eta \cdot \dot{\gamma} \quad (2)$$

onde a constante de proporcionalidade ( $\eta$ ) é chamada de viscosidade.

Idealmente, líquidos Newtonianos deveriam ser incompressíveis (seu volume não se altera com a aplicação de uma força), isotrópicos (suas propriedades são as mesmas em todas as direções) e homogêneos. Porém, muitos alimentos líquidos que não se encaixam nesses critérios e apresentam comportamento reológico descrito pela Equação 2 como, por exemplo, leite, soluções de sacarose, salmoura e mel. Entretanto, existem muitos outros alimentos que exibem comportamento líquido não-ideal (MCCLEMENTS, 2005). O comportamento reológico não-ideal pode se manifestar de diversas maneiras em um líquido, de modo que a viscosidade dos sistemas pode depender da taxa de deformação ou do tempo de aplicação da tensão (MACOSKO, 1994). No primeiro caso, a viscosidade pode aumentar ou diminuir com o aumento da taxa de deformação, sendo a viscosidade específica para cada taxa de deformação chamada de viscosidade aparente (WALSTRA, 2003). A escolha da taxa de deformação a ser utilizada no cálculo da viscosidade aparente é de fundamental importância, considerando que ela representa os processos que ocorrem na formulação de emulsões alimentícias, como agitação, escoamento através de tubulação, cremeação de uma gota individual de emulsão, ou mastigação de um alimento (Tabela 2.1) (MCCLEMENTS, 2005).

**Tabela 2.1.** Taxas de deformação típicas observadas em alguns processos relevantes para emulsões alimentícias.

Processo	Taxa de deformação ( $s^{-1}$ )
Bombeamento	$10^0$ a $10^3$
Agitação	$10^1$ a $10^3$
Mastigação	$10^1$ a $10^2$
Cremação	$10^{-6}$ a $10^{-3}$

Fonte: Adaptado de Vanapalli e Coupland (2004).

Os dois tipos mais comuns de líquidos não newtonianos dependentes da taxa de deformação são os fluidos pseudoplásticos e dilatantes. Os fluidos pseudoplástico são aqueles cuja viscosidade aparente diminui com o aumento da taxa de deformação, provavelmente devido ao alinhamento de partículas não-esféricas, remoção de moléculas de solvente ligadas às partículas ou ruptura e deformação de gotas floculadas (MCCLEMENTS, 2005; NEWSTEIN et al., 1999). Já os fluidos dilatantes são aqueles que apresentam um comportamento oposto aos fluidos pseudoplásticos, com um aumento da viscosidade à medida que a taxa de deformação aumenta (MCCLEMENTS, 2005).

Já no caso dos sistemas dependentes do tempo, tem-se que a viscosidade dos fluidos pode aumentar ou diminuir com o tempo de cisalhamento. Esse comportamento também é de grande importância para a indústria de alimentos, já que a duração de processos como bombeamento ou agitação devem ser cuidadosamente controlados. Essa dependência do tempo é usualmente associada com algum tipo de processo de relaxação, já que quando uma força externa é aplicada a um material em equilíbrio, este demora um determinado intervalo de tempo para atingir uma nova condição de equilíbrio, que é denominado tempo de relaxação. Assim, os comportamentos reológicos dependentes do tempo podem ser classificados como tixotrópico e reopético. No comportamento tixotrópico, a viscosidade aparente do fluido diminui com o tempo de cisalhamento sob uma taxa de deformação constante, enquanto que no comportamento reopético ocorre o oposto. As propriedades reológicas dependentes do tempo podem ser caracterizadas pela medida da viscosidade aparente durante a aplicação de uma taxa de deformação constante. Porém, esta propriedade também pode ser medida com o aumento da taxa de deformação a partir de zero até um determinado valor, seguida pela

diminuição até zero novamente. Assim, quando existe relaxação estrutural do sistema, a curva de subida é diferente da curva de descida (MCCLEMENTS, 2005).

### 2.6.3. Plásticos

Um grande número de emulsões alimentícias exhibe comportamento reológico conhecido como plástico, como por exemplo, maionese, margarina e manteiga. Este tipo de material apresenta uma tensão conhecida como tensão residual, de modo que apenas escoar quando essa tensão é excedida. Alimentos que exibem este tipo de comportamento geralmente apresentam uma rede de moléculas agregadas ou partículas dispersas em uma matriz líquida (WALSTRA, 2003). O material plástico ideal é chamado plástico de Bingham, o qual apresenta um comportamento linear ( $\sigma$  vs  $\dot{\gamma}$ ) para tensões acima da tensão residual. Entretanto, esses materiais também podem exibir um comportamento não-ideal, apresentando um comportamento não-linear para valores superiores à tensão residual.

### 2.6.4. Materiais viscoelásticos

Muitas emulsões alimentícias, entretanto, não são nem líquidos puros e nem sólidos puros, apresentando propriedades reológicas que são parcialmente elásticas e parcialmente viscosas (WALSTRA, 2003). Os materiais plásticos exibem comportamento elástico abaixo de determinado valor de tensão, e comportamento viscoso acima desse valor, porém os materiais viscoelásticos apresentam ambos os comportamentos simultaneamente. Em relação à energia, os sólidos ideais armazenam toda a energia mecânica na deformação de suas ligações, a qual retorna para a forma de energia mecânica quando a força é removida. Por outro lado, em um líquido ideal toda a energia mecânica aplicada ao material é dissipada devido ao atrito, sendo convertida para a forma de calor. Já nos materiais viscoelásticos, parte da energia é estocada no material, enquanto que parte é dissipada na forma de calor. Dessa maneira, quando uma força é aplicada ao material viscoelástico, ele não se deforma instantaneamente e nem retorna à sua forma original quando a força é retirada. Assim, as propriedades reológicas de um material viscoelástico são compostas por uma contribuição elástica e uma viscosa (MCCLEMENTS, 2005).

As propriedades viscoelásticas dos materiais podem ser obtidas a partir dos ensaios a baixas taxas de deformação. De um modo geral, estes podem ser classificados como ensaios

transientes e oscilatórios. No primeiro caso, aplica-se uma tensão ou deformação instantânea no material e observa-se a resposta (deformação ou tensão) ao longo do tempo. Os ensaios no qual a tensão é aplicada, e observa-se como o material se deforma com o tempo, são denominados de ensaios de “creep” ou fluência, sendo que nestes também é possível verificar a recuperação da deformação do material após a remoção da carga (“creep recovery”). Relaxação de tensões é a denominação dos ensaios nos quais uma deformação é aplicada (por exemplo 5 %) e a tensão é medida ao longo do tempo (STEFFE, 1996). Já no caso dos ensaios oscilatórios, uma tensão ou deformação senoidal é aplicada, obtendo-se como resposta a deformação ou tensão oscilatória.

## **CAPÍTULO 3. Material e métodos**





### 3.1. MATERIAL

Os ingredientes utilizados para o preparo dos sistemas foram caseína, goma jataí (LBG) e glucona- $\delta$ -lactona (GDL) adquiridos da Sigma Chemical Co. (USA), além do óleo de soja (Soya, Bunge Alimentos S.A, Brasil) comprado em um supermercado local. O óleo de soja foi utilizado por ser amplamente consumido e comercializado no Brasil. Azida sódica ( $\text{NaN}_3$ ) adquirida da Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA) foi adicionada às soluções para evitar crescimento microbiano. Os demais ingredientes utilizados eram de grau analítico.

### 3.2. PREPARO DOS SISTEMAS

#### 3.2.1. Preparo das soluções estoque dos biopolímeros

A solução estoque de caseinato de sódio foi preparada pela dispersão da caseína em água deionizada sob agitação magnética por 3 h em uma temperatura máxima de 50 °C. O pH foi constantemente ajustado para 7,0 com o uso de NaOH 10 mol/L. A solução estoque de jataí foi preparada pela dispersão do pó em água deionizada à temperatura ambiente, seguida por um tratamento térmico a 80 °C por 30 minutos para completa hidratação. Após o tratamento térmico, esta solução foi resfriada imediatamente à temperatura ambiente em banho de gelo. Estas soluções foram utilizadas para o preparo de emulsões óleo-água (O/A), emulsões água-água (A/A) e emulsões múltiplas. Para a formulação de emulsões A/A e emulsões múltiplas, as partículas insolúveis da solução de jataí foram separadas por centrifugação em uma ultracentrífuga L8-80M (Beckman, USA) a 60000g por 60 minutos (ANTONOV *et al.*, 2004).

#### 3.2.2. Preparo das emulsões óleo-água (O/A)

As soluções estoque de caseinato de sódio (6 % m/v) e LBG (1,5 % m/v) foram preparadas conforme o item 3.2.1 e diluídas para o preparo das emulsões O/A. Azida sódica (0,02 % m/v) foi adicionada para prevenir crescimento microbiano. O óleo de soja foi então misturado às soluções aquosas de biopolímeros utilizando-se um triturador – misturador tipo “Ultra Turrax” modelo T18 (IKA, Alemanha) a 14000 rpm por 4 minutos, sendo o óleo adicionado aos poucos para melhor homogeneização das emulsões. Os seguintes sistemas foram avaliados: (i) emulsões estabilizadas por caseinato de sódio, (ii) emulsões estabilizadas por caseinato de sódio e LBG, (iii) emulsões estabilizadas por caseinato de sódio homogeneizadas a alta pressão e (iv) emulsões acidificadas estabilizadas por caseinato de

sódio. No primeiro tipo de sistema, a concentração de Na-CN foi fixada em 1 %, 1,4 % e 4 % (m/v) e o conteúdo de óleo variou entre 10 e 60 % (v/v). A concentração de 1,4 % (m/v) de Na-CN foi escolhida por ser a quantidade apropriada de proteína para recobrir a superfície das gotas de óleo em uma emulsão O/A contendo 30 % de óleo, sem que exista excesso da mesma na fase aquosa (MOSCHAKIS *et al.*, 2005). Desta forma, as concentrações de 1 % (m/v) e 4 % (m/v) Na-CN foram estudadas para a observação dos efeitos da coalescência das gotas e da floculação por depleção, respectivamente, quando a concentração de óleo era de 30 % (v/v). No segundo tipo de sistema, as concentrações de Na-CN e óleo foram fixadas em 1 % (m/v) e 30 % (v/v), respectivamente, e a concentração de LBG variou de 0 % (m/v) a 0,8 % (m/v). Neste caso, estas concentrações de proteína e óleo foram escolhidas para assegurar a formação de emulsões instáveis quando fosse adicionada somente proteína, sendo possível a avaliação do efeito da LBG na estabilidade dos sistemas. Da mesma maneira, nas emulsões homogeneizadas a altas pressões, o mesmo sistema composto por 1 % (m/v) Na-CN e 30 % (v/v) óleo foi utilizado, sendo o mesmo passado através de um homogeneizador de dois estágios Panda 2K NS1001L (Niro Soavi, Itália) a uma pressão entre 100 e 600 bar no primeiro estágio e de 50 bar no segundo estágio. Neste equipamento, a pressão é controlada manualmente através da abertura ou fechamento de uma válvula. Nas emulsões acidificadas, o conteúdo de Na-CN e óleo novamente foi fixado como nos sistemas anteriores (1 % m/v Na-CN e 30 % v/v óleo), porém o pH foi ajustado para 7,0, 6,6, 5,6, 5,0, 3,7 e 2,7 pela adição de GDL em diferentes razões GDL/proteína (% m/m): 0, 0,021, 0,083, 0,135, 0,45 e 3,8, respectivamente.

### **3.2.3. Preparo e avaliação da compatibilidade das misturas de biopolímeros**

As soluções estoque de caseinato de sódio (12 % m/v) e de LBG (1,6 % m/v) foram preparadas separadamente conforme o item 3.2.1, diluídas para as concentrações desejadas, e misturadas sob agitação magnética por 1 h em temperatura ambiente. Após isso, as soluções foram colocadas em tubos de centrífuga de policarbonato de 10,5 mL, e centrifugadas a 60000 g durante 60 minutos (ANTONOV *et al.*, 2004). Após centrifugação, foram determinadas quais amostras apresentaram separação de fases macroscópicas para a construção de diagramas de fases visuais. As soluções mistas foram avaliada sob três diferentes condições do meio: (i) pH neutro, (ii) força iônica ajustada com adição de cloreto de cálcio para 0,01 mol/L,

0,02 mol/L, 0,06 mol/L e 0,12 mol/L através da relação  $\mu = \frac{1}{2} \cdot \sum_{i=1}^n c_i \cdot z_i^2$ , onde  $c$  é a concentração molar e  $z$  é a carga, e (iii) pH ajustado para 7,0, 6,5, 6,25, 6,0, 5,75, 5,5 e 5,25 através de acidificação direta com o uso de HCl 0,5 mol/L ou por acidificação lenta com GDL.

#### 3.2.4. Preparo das emulsões água-água (A/A)

Para o preparo das emulsões A/A foi utilizada uma solução contendo 4 % (m/v) de caseinato de sódio e 0,4 % (m/v) de LBG em pH 5,5. Esta condição foi escolhida por resultar na formação de uma solução de fases separadas contendo volumes similares de fases superior e inferior. Assim, primeiramente uma solução mista de biopolímeros com essa composição foi preparada e centrifugada a 60000 g por 60 minutos para a separação das fases. Amostras das fases superior e inferior foram cuidadosamente coletadas e utilizadas para o preparo de uma série de emulsões A/A com diferentes razões mássicas de fase superior e inferior: 0:4, 1:3, 2:2, 3:1 e 4:0. Essas emulsões foram preparadas em béqueres de 30 mL através de agitação magnética por 30 segundos (KIM et al., 2006).

#### 3.2.5. Preparo das emulsões múltiplas

As emulsões múltiplas foram preparadas pela mistura de 0,5 g de uma emulsão óleo/água (1 % Na-CN e 30 % de óleo em pH 5,5) com 10 g de cada uma das emulsões A/A preparadas no item 3.2.3. Essas emulsões foram preparadas em béqueres de 30 mL através de agitação magnética por 30 s (KIM et al., 2006).

### 3.3. ANÁLISES

#### 3.3.1. Análises químicas

A concentração de proteína foi determinada pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1996) com um fator proteína-nitrogênio de 6,25, enquanto que a concentração de LBG foi determinada através do método Fenol-Sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). A concentração de óleo foi determinada por diferença, a partir da concentração dos outros componentes, e confirmada utilizando-se o método de Bligh & Dyer (BLIGH & DYER, 1959).

### 3.3.2. Análise da razão de volumes

A análise da razão de volumes foi utilizada para a verificação do balanço de massa de alguns sistemas que apresentaram separação de fases. Essa verificação foi feita através da comparação entre a razão de volumes teórica ( $VR_{teórica}$ ) e experimental ( $VR_{exp}$ ) (ANTONOV et al., 2004). A razão de volumes experimental foi calculada através da razão entre os volumes das fases separadas:

$$VR_{exp} = \frac{V_{FS}}{V_{total}} \quad (3)$$

onde  $VR_{exp}$  é a razão de volume experimental,  $V_{FS}$  é o volume da fase superior e  $V_{total}$  é o volume total da mistura. Para isso, o volume de cada fase foi determinado através do enchimento do tubo de centrífuga com água até a marca do menisco, seguido pela pesagem da quantidade de água adicionada a 25°C. A densidade de cada fase foi considerada igual a 1 g/cm<sup>3</sup>.

Já a razão de volume teórica foi determinada a partir da regra da alavanca inversa (ANTONOV et al., 2004) (Equação 4).

$$VR_{teórica} = \frac{V_{FS}}{V_{total}} = \frac{A}{B} \quad (4)$$

$$A = X_{FI} - X_{SI} \quad (5)$$

$$B = X_{FI} - X_{FS} \quad (6)$$

onde  $VR_{teórica}$  é a razão de volumes teórica e  $X_{FI}$ ,  $X_{SI}$  e  $X_{FS}$  são as concentrações de proteína na fase inferior, solução inicial e fase superior, respectivamente.

### 3.3.3. Avaliação da estabilidade à cremeação

Imediatamente após o preparo das emulsões, alíquotas de 10 mL de cada amostra foram transferidas para tubos cilíndricos graduados (diâmetro interno = 15,5 mm, altura = 65 mm), selados e estocados à temperatura ambiente por uma semana, sendo o volume da fase aquosa quantificado diariamente. As emulsões apresentaram separação de fases com a formação de uma fase superior oleosa e uma fase inferior aquosa, sendo a estabilidade medida através da altura da fase inferior (H) com o tempo de estocagem. O índice de cremeação (IC) foi descrito através da Equação 7:

$$IC (\%) = (H/H_0) \times 100 \quad (7)$$

onde  $H_0$  representa a altura inicial (KEOWMANEECHAI & MCCLEMENTS, 2002).

### 3.3.4. Medidas reológicas

Para a determinação das propriedades reológicas das emulsões foi utilizado um reômetro de tensão controlada (Carri-Med CSL2500, TA Instruments, England). As emulsões O/A foram analisadas após 7 dias de estocagem, de modo a garantir o equilíbrio cinético (índice de cremação constante), sendo as diferentes fases analisadas separadamente. Já as emulsões A/A foram avaliadas imediatamente após o seu preparo, sendo possível associar as propriedades reológicas com a estabilidade destes sistemas. Todas as medidas foram feitas em triplicata em uma temperatura de 25 °C. Para a avaliação da fase superior das emulsões O/A, foi utilizada uma geometria de placa rugosa de 4 cm de diâmetro, enquanto que uma geometria de cilindros concêntricos de parede dupla, composta por um cilindro de acrílico interno (raio interno = 20,38 mm, raio externo = 21,96 mm) e um copo fixo externo de aço inox (raio interno = 20 mm, raio externo = 22,38 mm), foi utilizada para a análise das demais amostras. Curvas de escoamento foram obtidas através do programa de passos múltiplos, utilizando intervalos de tensão de cisalhamento diferentes para cada amostra, de modo a se obter aproximadamente um intervalo de 0 - 300 s<sup>-1</sup> de taxa de deformação. Os modelos para fluidos Newtonianos (8), pseudoplásticos (9) e de Herschel-Bulkley (10) foram utilizados para ajustar as curvas de escoamento:

$$\sigma = \eta \cdot \dot{\gamma} \quad (8)$$

$$\sigma = k \cdot (\dot{\gamma})^n \quad (9)$$

$$\sigma = \sigma_0 + k \cdot (\dot{\gamma})^n \quad (10)$$

onde  $\dot{\gamma}$  é a taxa de deformação,  $n$  é o índice de comportamento,  $\sigma_0$  é a tensão residual, e  $k$  é o índice de consistência.

As propriedades viscoelásticas dinâmicas foram determinadas utilizando-se as mesmas geometrias empregadas para as medidas em estado estacionário a 25 °C. Varreduras de frequência entre 0,01 e 10 Hz foram feitas para a fase superior das emulsões O/A como forma de caracterizar a estrutura viscoelástica desses materiais, enquanto que varreduras de tempo (1 Hz / 30 minutos) foram realizadas para as emulsões A/A para a avaliação da estabilidade desses sistemas. As figuras de Lissajous foram plotadas em cada ponto para garantir que as

medidas estivessem dentro do intervalo de viscoelasticidade linear. Os parâmetros determinados foram módulo elástico ( $G'$ ) e módulo viscoso ( $G''$ ), a partir dos quais foi possível o cálculo do módulo complexo  $G^* = \sqrt{G'^2 + G''^2}$ .

### 3.3.5. Microscopia ótica e análise de imagens

A microestrutura da fase superior das emulsões O/A foi avaliada após 7 dias de estocagem através de microscopia ótica. Para isso, as amostras foram colocadas em lâminas, cobertas com lamínulas e observadas em um microscópio óptico Carl Zeiss modelo mf-AKS 24 x 36 EXPOMET (Zeiss, Alemanha) com um aumento de 400 x. Foram obtidas cerca de 10 imagens de cada amostra, de modo a varrer a lâmina inteira, obtendo-se um resultado representativo.

As imagens de microscopia foram analisadas utilizando-se o software de análise de imagens Image J 1.36b (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Primeiramente, as microscopias foram convertidas para imagens em escala de cinza 8-bit de 640-480 pontos, apresentando níveis de cinza entre 0 e 255. Cada uma das imagens foi então binarizada, utilizando-se a mediana do histograma do nível de cinza como parâmetro de binarização (PUGNALONI et al., 2005). Após isso, a escala das imagens foi determinada através de uma conversão de pontos para micrômetros e, então, foram feitas as medidas de área, circularidade e perímetro das gotas das emulsões (Anexo 1). Considerando que as gotas de óleo são perfeitamente esféricas, pode-se calcular o diâmetro médio superficial das gotas ( $d_{32}$ ) utilizando-se a equação 11.

$$d_{32} = \sum n_i d_i^3 / \sum n_i d_i^2 \quad (11)$$

onde  $n_i$  é o número de gotas com diâmetro  $d_i$ .

A técnica de microscopia ótica também foi usada para a observação da microestrutura das emulsões múltiplas utilizando-se aumentos de 200 x e 500 x.

Como as emulsões O/A homogeneizadas a altas pressões apresentaram gotas de óleo com tamanhos muito pequenos, não foi possível a realização de análises de imagens para a determinação do tamanho das gotas, sendo necessária a utilização da técnica de espalhamento de luz.

### **3.3.6. Técnica de espalhamento de luz**

O tamanho de gotas das emulsões O/A homogeneizadas a altas pressões foi determinado através da técnica de espalhamento de luz utilizando-se um equipamento Laser Scattering Spectrometer Mastersizer S modelo MAM 5005 (Malvern Instruments LTD., U.K). Essas medidas foram realizadas a 25 °C após 7 dias do preparo das amostras. O diâmetro médio foi novamente determinado com base na relação área superficial – volume através do parâmetro  $d_{32}$  (Equação 11).

### **3.3.7. Microscopia de fluorescência**

A microscopia de fluorescência foi utilizada para analisar a estrutura das emulsões A/A. Para essa análise, o corante Rodamina B foi adicionado às amostras (20 µL de uma solução 1 mg/mL) de maneira a marcar as moléculas de proteínas presentes. As emulsões foram então colocadas em lâminas, cobertas com lamínulas e observadas em um microscópio de fluorescência Leica DMI 4000B (Leica, Alemanha), utilizando-se lentes com aumentos de 100 x.

### **3.3.8. Análise Estatística**

A comparação entre os tamanhos das gotas foi feito através de análise de variância-ANOVA em que diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) foram determinadas pelo teste de Tukey utilizando o software STATISTICA 5.5 (Statsoft Inc., Tulsa USA, 2000).





## **CAPÍTULO 4. Resultados e discussões**

### **PARTE 1. ESTUDO DE EMULSÕES ÓLEO-ÁGUA ESTABILIZADAS POR Na-CN**

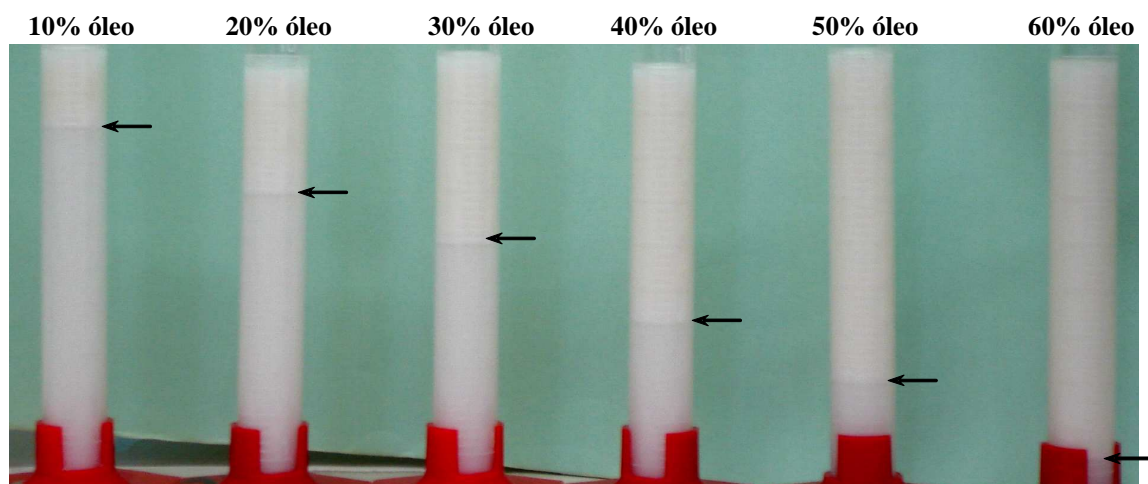


Inicialmente, foi realizado um estudo das emulsões óleo-água (O/A) estabilizadas por caseinato de sódio de maneira a avaliar a estabilidade desse tipo de sistema, possibilitando o preparo das emulsões múltiplas em uma próxima etapa do trabalho. Estudos anteriores mostraram que emulsões O/A estabilizadas por caseinato de sódio geralmente permanecem estáveis ao processo de coalescência, porém são susceptíveis ao processo de cremação (DICKINSON, 1999). Esse último mecanismo de desestabilização promove a diminuição da qualidade das emulsões alimentícias tanto em relação à aparência, quanto à textura. No entanto, existem diversas maneiras de aumentar a estabilidade desse tipo de emulsão como, por exemplo, pela diminuição da diferença de densidade entre as fases, aumento da concentração de gotas (fração de volume da fase dispersa), redução do tamanho de gotas e modificação da reologia da fase contínua (MCCLEMENTS, 2005), sendo estes três últimos utilizados no presente estudo.

#### **4.1. EMULSÕES EM PH NEUTRO**

##### **4.1.1. Variação na concentração dos componentes**

Emulsões O/A estabilizadas por caseinato de sódio foram preparadas em pH 7,0 utilizando-se concentrações variadas de óleo (10 % v/v a 60 % v/v) e proteína (1 %, 1,4 % e 4 % m/v). Sob essas condições, a maioria das emulsões apresentou separação de fases com a formação de uma fase superior oleosa e uma inferior aquosa, com exceção da emulsão composta por 4 % (m/v) Na-CN e 60 % (v/v) óleo que se manteve estável mesmo após 7 dias de estocagem. A separação de fases observada nestas emulsões ocorreu devido ao mecanismo de cremação, sendo este processo mais acentuado nas primeiras 24 horas após o preparo das amostras. A Figura 4.1 apresenta um perfil típico de cremação das emulsões, no qual a fase inferior (fase aquosa) das amostras diminuiu quase linearmente com o aumento da concentração de óleo (fração de volume da fase dispersa). Todas as emulsões estabilizadas por Na-CN apresentaram um comportamento similar, porém foram observadas diferenças na altura final das fases e na taxa de separação de fases.



**Figura 4.1.** Efeito da concentração de óleo no perfil de cremação de emulsões óleo-água com 1 % (m/v) de caseinato de sódio após 7 dias de estocagem.

A Tabela 4.1 apresenta o índice de cremação, calculado a partir da Equação 7, das emulsões compostas por 1 %, 1,4 % e 4 % de caseinato de sódio e concentração de óleo variando de 10 % a 60 %. Analisando-se estes resultados, pode-se observar claramente que o comportamento de separação de fases foi fortemente influenciado pelas concentrações de óleo e proteína presentes no sistema, sendo que o efeito do óleo foi mais pronunciado do que o da proteína. No entanto, a influência da concentração de proteína foi mais evidente nas amostras compostas por maiores concentrações deste biopolímero e maiores teores de óleo. A partir da razão entre os volumes da fase oleosa e do volume de óleo adicionado ao sistema, pode-se verificar que em todas as situações, com exceção daquela que apresenta maior concentração de proteína, a quantidade de água presente na fase superior foi proporcional ao aumento do volume da fase oleosa.

**Tabela 4.1.** Índice de cremação das emulsões estabilizadas por Na-CN mensurado pelo volume da fase inferior

Na-CN \ Óleo						
	10 %	20 %	30 %	40 %	50 %	60 %
1 %	85 %	72 %	58 %	45 %	30 %	16 %
1,4 %	85 %	72 %	57 %	44 %	29 %	15 %
4 %	83 %	70 %	56,5 %	40 %	15 %	0

A Tabela 4.2 apresenta a composição química do sistema inicial e das fases separadas das emulsões compostas por 1 % (m/v) e 4 % (m/v) de caseinato de sódio e concentração de

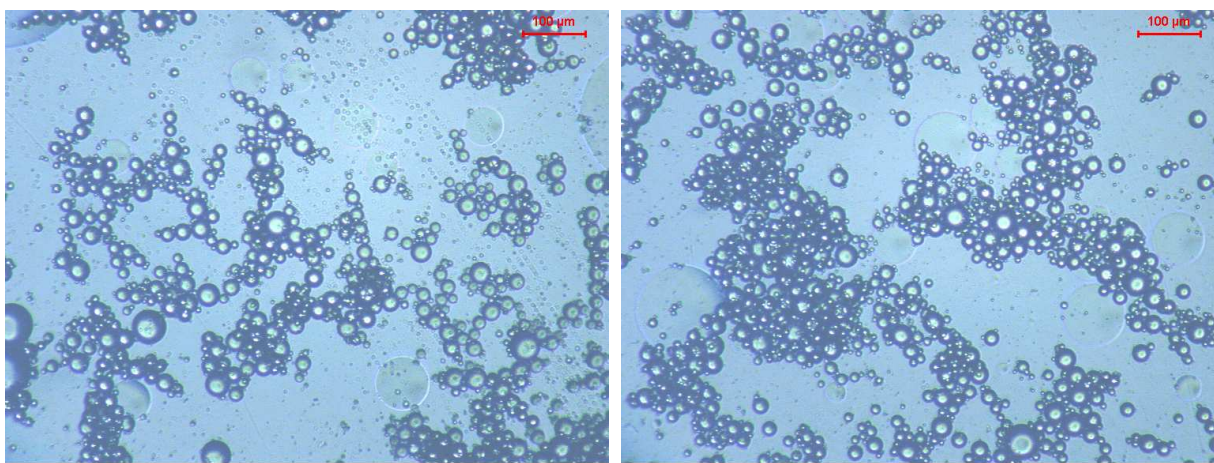
óleo variando entre 10 % (v/v) e 60 % (v/v). Estas análises foram realizadas após 7 dias de estocagem, após as amostras atingirem um equilíbrio cinético (índice de cremeação constante). Os resultados para os sistemas compostos por 1,4 % (m/v) de proteína não foram apresentados por resultarem em valores muito similares aos apresentados para os sistemas contendo 1 % (m/v) Na-CN. A partir da análise química do sistema inicial e das fases separadas (Tabela 4.2), verificou-se que o aumento nas concentrações de óleo e proteína na solução inicial levou a uma pequena diminuição na razão óleo/água e a uma elevação na razão proteína/óleo na fase superior das emulsões. Como a fase superior é rica em óleo, o aumento da razão proteína/óleo representa uma maior quantidade de proteína disponível para recobrir a superfície das gotas, sendo este fato relacionado com a melhora da estabilidade dos sistemas. Já para a fase inferior das emulsões, foi observado o aumento da razão proteína/água conforme maiores concentrações de proteína e óleo foram adicionadas à solução inicial e, como esta fase é rica em água, pode-se concluir que a estabilidade das emulsões está relacionada com o aumento da razão emulsificante/componente predominante na fase. Além disso, a concentração de proteína foi maior na fase inferior das emulsões (fase aquosa), o que pode indicar uma maior afinidade da proteína com esse solvente. As caseínas, particularmente  $\alpha_{s1}$  e  $\beta$ , são proteínas anfifílicas devido a sua estrutura aberta, com predominância de estruturas primárias e secundárias. No entanto, estas apresentam diferentes estruturas, sendo que a  $\beta$ -caseína apresenta a parte carboxiterminal com muitos resíduos apolares e a região aminoterminal contendo resíduos hidrofílicos, enquanto que a  $\alpha_{s1}$ -caseína possui três regiões hidrofóbicas distintas (DICKINSON, 1999).

**Tabela 4.2.** Composição química da solução inicial das emulsões e de suas fases separadas após 7 dias de estocagem

Composição inicial		Fase superior					Fase inferior			
Proteína (%)	Óleo (%)	Proteína (%)	Água (%)	Óleo (%)	Razão óleo/água	Razão prot/óleo·10 <sup>-3</sup>	Proteína (%)	Água (%)	Óleo (%)	Razão prot/água·10 <sup>-3</sup>
1,0	10	0,39 ± 0,18	25,60 ± 0,02	74,01 ± 0,18	2,9	5,3	0,44 ± 0,02	98,80 ± 0,12	0,76 ± 0,12	4,4
1,0	20	0,48 ± 0,13	25,98 ± 0,05	73,54 ± 0,14	2,8	6,5	0,73 ± 0,06	98,66 ± 0,19	0,61 ± 0,20	7,4
1,0	30	0,48 ± 0,08	26,50 ± 0,01	73,03 ± 0,08	2,8	6,5	0,82 ± 0,10	98,13 ± 0,07	1,05 ± 0,12	8,4
1,0	40	0,54 ± 0,12	26,83 ± 0,06	72,62 ± 0,13	2,7	7,4	1,11 ± 0,03	97,83 ± 0,88	1,07 ± 0,88	11,3
1,0	50	0,59 ± 0,10	26,99 ± 0,07	72,42 ± 0,12	2,7	8,1	1,32 ± 0,07	97,75 ± 0,20	0,93 ± 0,21	13,5
1,0	60	0,84 ± 0,04	27,68 ± 0,20	71,48 ± 0,20	2,6	11,8	1,63 ± 0,03	96,23 ± 0,69	2,14 ± 0,69	16,9
4,0	10	0,76 ± 0,03	26,22 ± 0,83	73,02 ± 0,83	2,8	10,4	3,60 ± 0,03	95,74 ± 0,14	0,66 ± 0,14	37,6
4,0	20	1,02 ± 0,02	26,37 ± 0,20	72,60 ± 0,20	2,7	14,0	4,01 ± 0,07	95,08 ± 0,27	0,91 ± 0,28	42,2
4,0	30	1,25 ± 0,10	27,75 ± 0,23	71,00 ± 0,25	2,6	17,6	4,44 ± 0,07	94,61 ± 0,28	0,95 ± 0,29	46,9
4,0	40	1,56 ± 0,05	28,84 ± 0,17	69,60 ± 0,18	2,4	22,4	5,30 ± 0,08	93,69 ± 0,41	1,01 ± 0,42	56,6
4,0	50	2,09 ± 0,03	30,87 ± 0,12	67,04 ± 0,12	2,2	31,1	6,25 ± 0,08	93,15 ± 0,65	0,60 ± 0,65	67,1
4,0	60	2,85 ± 0,13	35,47 ± 0,99	61,68 ± 0,99	1,7	46,2	—	—	—	80,3

O tamanho das gotas é um parâmetro muito importante para diversas propriedades das emulsões como, por exemplo, vida de prateleira, aparência, textura e aroma. Consequentemente, é fundamental que se possa controlar e medir com precisão o tamanho das gotas em emulsões (MCCLEMENTS, 2005). A técnica de espalhamento de luz é provavelmente a mais utilizada para determinação desse parâmetro, entretanto as análises de microscopia são as que apresentam menores erros (BUCHHEIM, 1990; DALGLEISH, 1996), já que a determinação do tamanho de gotas através do método de espalhamento de luz requer uma diluição das amostras.

Para a avaliação do tamanho de gotas das emulsões, utilizou-se inicialmente a técnica de espalhamento de luz, diluindo-se as amostras de forma a se obter uma concentração de gotas de aproximadamente 0,005 % (m/m) (SURH *et al.*, 2006). No entanto, no momento em que as emulsões foram diluídas em água, houve desestabilização pelo mecanismo de floculação, conforme pode ser observado nas micrografias da emulsão composta por 1 % de caseinato de sódio e 60 % de óleo diluída em água (Figura 4.2). Neste mecanismo de desestabilização, observa-se a formação de agregados de gotas, porém sem o rompimento da parede das mesmas.



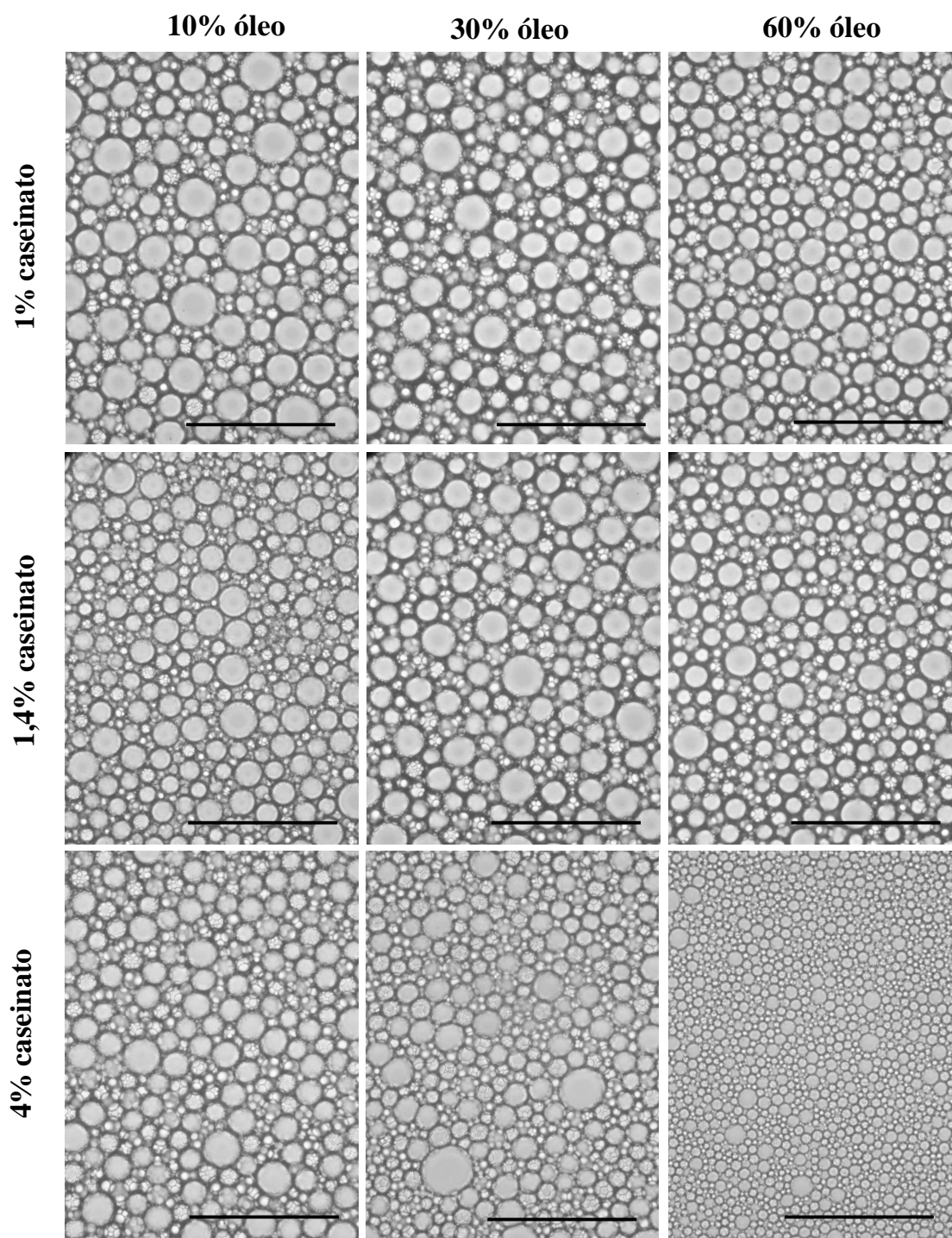
**Figura 4.2.** Micrografia das emulsões O/A com 1 % (m/v) de caseinato de sódio e concentração de óleo de 60 % (v/v) preparadas para avaliação na técnica de espalhamento de luz. Barra da escala = 100 μm.

Devido a esta desestabilização, o equipamento apresentou um falso resultado, indicando um tamanho médio de partículas de 100 μm. Porém, pelas imagens de microscopia,

foi possível verificar que as gotas apresentam um diâmetro muito menor. Optou-se, então, pela avaliação do tamanho das gotas através das imagens de microscopia das emulsões, já que as técnicas de microscopia são amplamente utilizadas para a visualização de emulsões sem diluição e com um mínimo preparo das amostras (LANGTON *et al.*, 1999). Assim, para a determinação da influência da concentração dos ingredientes no tamanho das gotas, foram utilizadas imagens da fase superior das emulsões (fase oleosa) (Figura 4.3). A microestrutura da fase inferior não foi apresentada devido à ausência de gotas de óleo.

Visualmente, as imagens apresentadas na Figura 4.3 não apresentam grandes diferenças em relação ao tamanho das gotas, com exceção da amostra que contém 4 % (m/v) de caseinato e 60 % (v/v) de óleo que apresentou gotas claramente menores. Além disso, as estruturas mostraram-se bastante homogêneas e com ausência de floculação. Assim, para uma avaliação mais precisa da influência dos ingredientes no tamanho das gotas, foram realizadas análises das imagens utilizando-se o Software Image J (Anexo 1). Para cada amostra, foram avaliadas 10 diferentes, imagens de maneira a aumentar a confiança dos resultados. A Tabela 4.3 apresenta os valores de diâmetro médio superficial ( $d_{32}$ ) para cada amostra analisada.





**Figura 4.3.** Microestruturas de emulsões O/A com concentração de caseinato de sódio de 1 %, 1,4 % e 4 % (m/v) e concentração de óleo de 10 %, 30 % e 60 % (v/v).

**Tabela 4.3.** Valores de  $d_{32}$  ( $\mu\text{m}$ ) para emulsões estabilizadas por caseinato de sódio

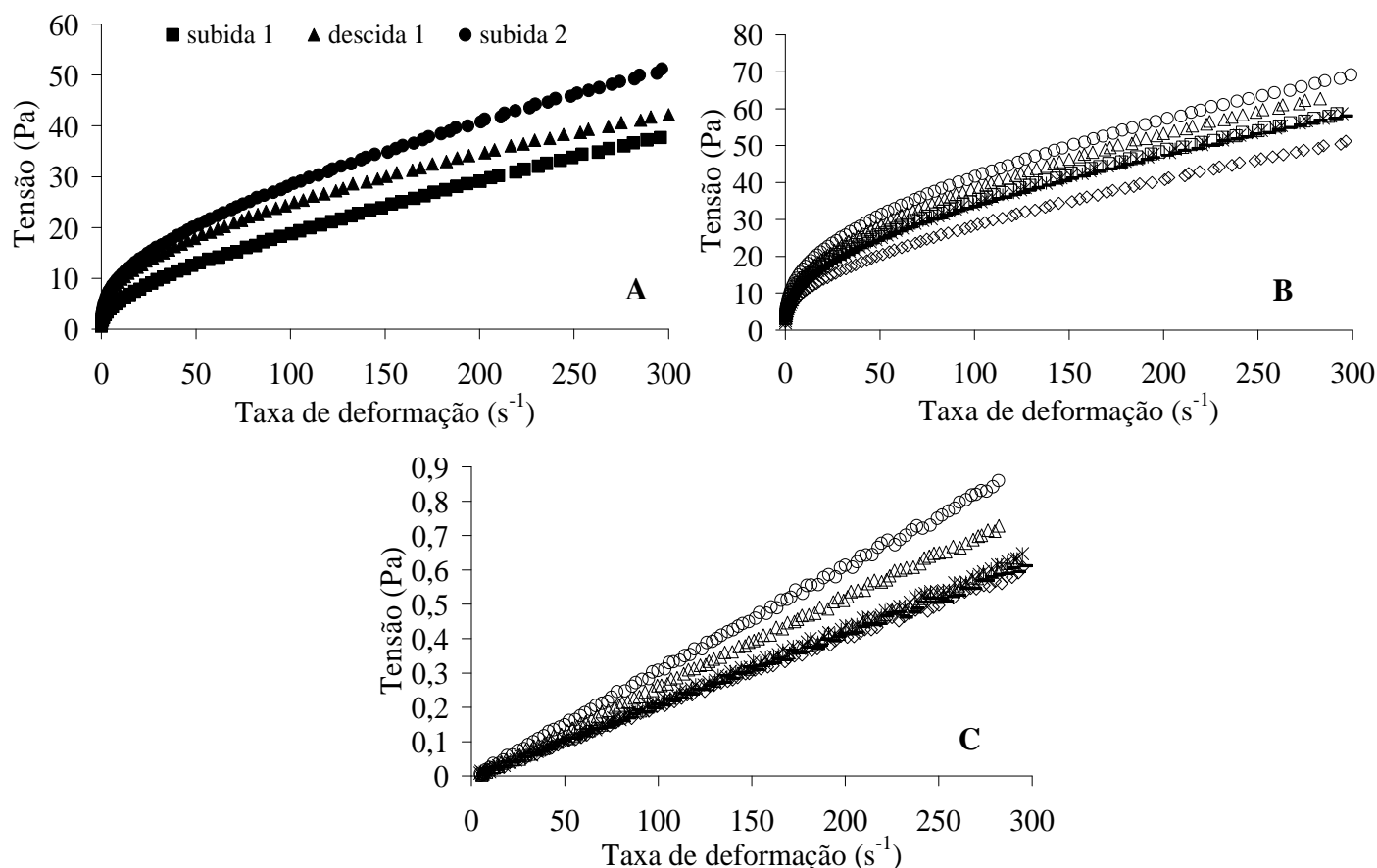
Óleo (v/v) Na-CN (m/v)	10 %	20 %	30 %	40 %	50 %	60 %
1 %	$15,88 \pm 0,63^{\text{Aa}}$	$15,03 \pm 0,77^{\text{Aa}}$	$14,41 \pm 0,41^{\text{Aa}}$	$13,14 \pm 0,70^{\text{Ba}}$	$13,03 \pm 0,68^{\text{Ba}}$	$11,80 \pm 0,56^{\text{Ca}}$
1,4 %	$14,24 \pm 1,25^{\text{Aa}}$	$13,40 \pm 1,26^{\text{ABb}}$	$14,44 \pm 0,40^{\text{Aa}}$	$14,57 \pm 1,05^{\text{Ab}}$	$14,20 \pm 0,75^{\text{Ab}}$	$12,07 \pm 0,51^{\text{Ba}}$
4 %	$12,80 \pm 0,77^{\text{Ab}}$	$12,33 \pm 0,38^{\text{Ac}}$	$10,74 \pm 0,31^{\text{Bb}}$	$10,52 \pm 0,54^{\text{Bc}}$	$8,41 \pm 0,25^{\text{Cc}}$	$6,14 \pm 0,29^{\text{Db}}$

Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). Letras maiúsculas: diferenças entre as concentrações de óleo para uma concentração fixa de caseinato. Letras minúsculas: diferenças entre as concentrações de proteína para uma mesma concentração de óleo.

Analisando-se os dados da Tabela 4.3, pode-se observar que, apesar das microscopias apresentarem imagens muito semelhantes, o tamanho das gotas das emulsões variou de (6,14 a 15,88)  $\mu\text{m}$  com a concentração dos ingredientes. Além disso, observou-se uma tendência de diminuição do tamanho das gotas tanto com o aumento da concentração de proteína quanto de óleo na solução inicial. O tamanho das gotas é um parâmetro que varia de acordo com o produto, por exemplo, o leite homogeneizado apresenta glóbulos de gordura com diâmetros médios em torno de (0,4 a 0,6)  $\mu\text{m}$  (WALSTRA, 1999), enquanto que a maionese apresenta diâmetro médio na faixa de (2 a 4)  $\mu\text{m}$  (LANGTON *et al.*, 1999). Entretanto, o tamanho das gotas pode variar para um mesmo produto dependendo da sua composição (tipo de emulsificante e concentração dos ingredientes) e das condições de processo empregadas (tipo de homogeneização, pressão aplicada, temperatura). Os molhos de salada, por exemplo, podem apresentar uma ampla variedade de tamanhos de gotas, sendo que molhos com maiores concentrações de óleo (30 % a 60 % v/v), como do tipo “Parmesão” ou “Rosé”, apresentam diâmetro médio na faixa de (2 a 3)  $\mu\text{m}$ , enquanto que aqueles compostos por um menor teor de óleo (30 % – 45 % v/v), como os do tipo “italiano”, apresentam maiores tamanhos de gotas (10  $\mu\text{m}$  a 40  $\mu\text{m}$ ) (FORD *et al.*, 1997). Relacionando os valores dos tamanhos de gotas (Tabela 4.3) com o comportamento de cremação (Tabela 4.1), observa-se que quanto menor o tamanho das gotas, maior é a estabilidade das emulsões. Uma relação similar entre índice de cremação e tamanho de gotas foi também observada para emulsões óleo-água estabilizadas por proteínas do soro e xantana (SUN *et al.*, 2007).

Medidas reológicas em estado estacionário foram realizadas para todas as emulsões. A Figura 4.4 apresenta, como exemplo, as curvas referentes às emulsões estabilizadas por 1,4 %

(m/v) Na-CN com variadas concentrações de óleo. As demais curvas apresentaram comportamento similar e estão apresentadas no Anexo 2.



**Figura 4.4.** Propriedades reológicas das emulsões O/A estabilizadas por 1,4 % (m/v) Na-CN com diferentes concentrações de óleo. A) Curva de escoamento da fase superior da amostra contendo 1,4 % (m/v) Na-CN e 10 % (v/v) óleo (dependência do tempo), B) curvas de escoamento da fase superior das emulsões e C) curvas de escoamento da fase inferior das emulsões. Concentração de óleo: ( $\diamond$ ) 10 %, ( $-$ ) 20 %, ( $\times$ ) 30 %, ( $\square$ ) 40 %, ( $\triangle$ ) 50 % e ( $\circ$ ) 60 % (v/v).

A Figura 4.4A apresenta o comportamento reológico em estado estacionário como uma função do tempo de cisalhamento para a fase superior da emulsão contendo 1,4 % (m/v) de caseinato de sódio e 10 % (v/v) de óleo. A partir destes resultados, pode-se notar que houve um aumento da viscosidade aparente com o tempo de cisalhamento para uma mesma taxa de deformação, caracterizando este fluido como reopético. Um explicação para este tipo de comportamento é que a aplicação de uma força de cisalhamento em uma emulsão aumenta tanto a frequência quanto a eficiência das colisões entre as gotas, o que leva a um aumento da

agregação e, conseqüentemente, a um aumento na viscosidade aparente com o tempo (MCCLEMENTS, 2005). Este tipo de comportamento foi observado para a fase superior de todas as amostras.

Eliminando a dependência do tempo de cisalhamento, curvas de escoamento em estado estacionário foram obtidas para a fase superior de todas as emulsões estudadas (Figura 4.4B). A partir destes resultados, pode-se observar a existência de um comportamento de fluido pseudoplástico com pequena tensão residual, já que a viscosidade aparente diminuiu com o aumento da taxa de deformação aplicada, sendo este o comportamento mais comum para a maioria das emulsões alimentícias. Neste caso, a pseudoplasticidade pode ocorrer por uma variedade de razões como, por exemplo, a alteração da distribuição espacial devido à aplicação de cisalhamento, alinhamento de gotas não esféricas, remoção de moléculas de solventes ligados às gotas, ou deformação e rompimento de flocos (HUNTER, 1993; MEWIS & MACOSKO, 1994; NEWSTEIN *et al.*, 1999). As curvas de escoamento foram ajustadas utilizando-se o modelo de Herschel-Bulkley (HB) e os valores de viscosidade aparente a  $100 \text{ s}^{-1}$  foram calculados (Tabela 4.4). A viscosidade a essas taxas de deformação foi avaliada de maneira a reproduzir alguns processos que ocorrem na produção de alimentos como, por exemplo, escoamento em tubulação, agitação ou mastigação de um alimento (STEFFE, 1996). A partir da Tabela 4.4, pode-se observar que a viscosidade a  $100 \text{ s}^{-1}$  e o índice de consistência (k) aumentaram gradualmente com a elevação da concentração de óleo, enquanto que os valores de índice de comportamento (n) diminuíram. Os valores de tensão residual não apresentaram uma clara tendência com o aumento no teor de óleo. Assim, tem-se que a elevação na concentração de óleo promoveu aumento da viscosidade da fase superior e de sua pseudoplasticidade. Já o aumento da concentração de proteína, resultou apenas em maiores valores de viscosidade a  $100 \text{ s}^{-1}$  e de tensão residual da fase superior, o que favoreceu a estabilidade das emulsões.

**Tabela 4.4.** Efeito das concentrações dos ingredientes no índice de consistência (k), índice de comportamento (n), tensão residual ( $\sigma_o$ ) e viscosidade ( $\eta$ ) a  $100 \text{ s}^{-1}$  da fase superior das emulsões estabilizadas por caseinato de sódio

óleo	1 % Na-CN				1,4 % Na-CN				4 % Na-CN			
	k (Pa.s <sup>n</sup> )	n	$\sigma_o$ (Pa)	$\eta_{100}$ (Pa.s)	k (Pa.s <sup>n</sup> )	n	$\sigma_o$ (Pa)	$\eta_{100}$ (Pa.s)	k (Pa.s <sup>n</sup> )	n	$\sigma_o$ (Pa)	$\eta_{100}$ (Pa.s)
10 %	2,41 <sup>Aa</sup>	0,527 <sup>Aa</sup>	2,26 <sup>Aa</sup>	0,30 <sup>Aa</sup>	1,84 <sup>Aa</sup>	0,569 <sup>Aa</sup>	3,02 <sup>Aa</sup>	0,28 <sup>Aa</sup>	2,68 <sup>Aa</sup>	0,551 <sup>Aa</sup>	3,43 <sup>Aa</sup>	0,37 <sup>Ab</sup>
20 %	3,06 <sup>ABa</sup>	0,502 <sup>ABa</sup>	1,91 <sup>ABa</sup>	0,33 <sup>ABa</sup>	2,72 <sup>Ba</sup>	0,525 <sup>Ba</sup>	3,64 <sup>Ab</sup>	0,34 <sup>Ba</sup>	3,47 <sup>ACa</sup>	0,517 <sup>ABa</sup>	2,86 <sup>Aa</sup>	0,41 <sup>Ab</sup>
30 %	3,07 <sup>ACa</sup>	0,504 <sup>ACa</sup>	1,57 <sup>ACa</sup>	0,33 <sup>ABa</sup>	2,99 <sup>Ba</sup>	0,514 <sup>BCa</sup>	3,05 <sup>Ab</sup>	0,35 <sup>Ba</sup>	5,56 <sup>Bb</sup>	0,458 <sup>Cb</sup>	3,99 <sup>Ab</sup>	0,50 <sup>Bb</sup>
40 %	3,69 <sup>BCDa</sup>	0,479 <sup>BCDa</sup>	1,32 <sup>BCDa</sup>	0,35 <sup>ABCa</sup>	3,25 <sup>BCa</sup>	0,502 <sup>BDb</sup>	3,45 <sup>Aa</sup>	0,36 <sup>BCa</sup>	7,50 <sup>Db</sup>	0,422 <sup>Cc</sup>	3,69 <sup>Aa</sup>	0,56 <sup>Cb</sup>
50 %	4,05 <sup>BCEa</sup>	0,476 <sup>BCEa</sup>	1,01 <sup>BCEa</sup>	0,37 <sup>BCa</sup>	3,62 <sup>CDa</sup>	0,493 <sup>CDa</sup>	3,40 <sup>Aab</sup>	0,38 <sup>Ca</sup>	4,75 <sup>BEa</sup>	0,500 <sup>BCa</sup>	3,29 <sup>Ab</sup>	0,51 <sup>Bb</sup>
60 %	4,46 <sup>DEa</sup>	0,461 <sup>DEa</sup>	1,35 <sup>ADEa</sup>	0,39 <sup>Ca</sup>	3,99 <sup>Db</sup>	0,489 <sup>Db</sup>	4,30 <sup>Ab</sup>	0,42 <sup>Da</sup>	4,25 <sup>CEa</sup>	0,573 <sup>Ac</sup>	4,78 <sup>Ab</sup>	0,64 <sup>Db</sup>

Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). Letras maiúsculas: diferenças entre as concentrações de óleo para uma concentração fixa de caseinato. Letras minúsculas: diferenças entre as concentrações de proteína para uma mesma concentração de óleo.

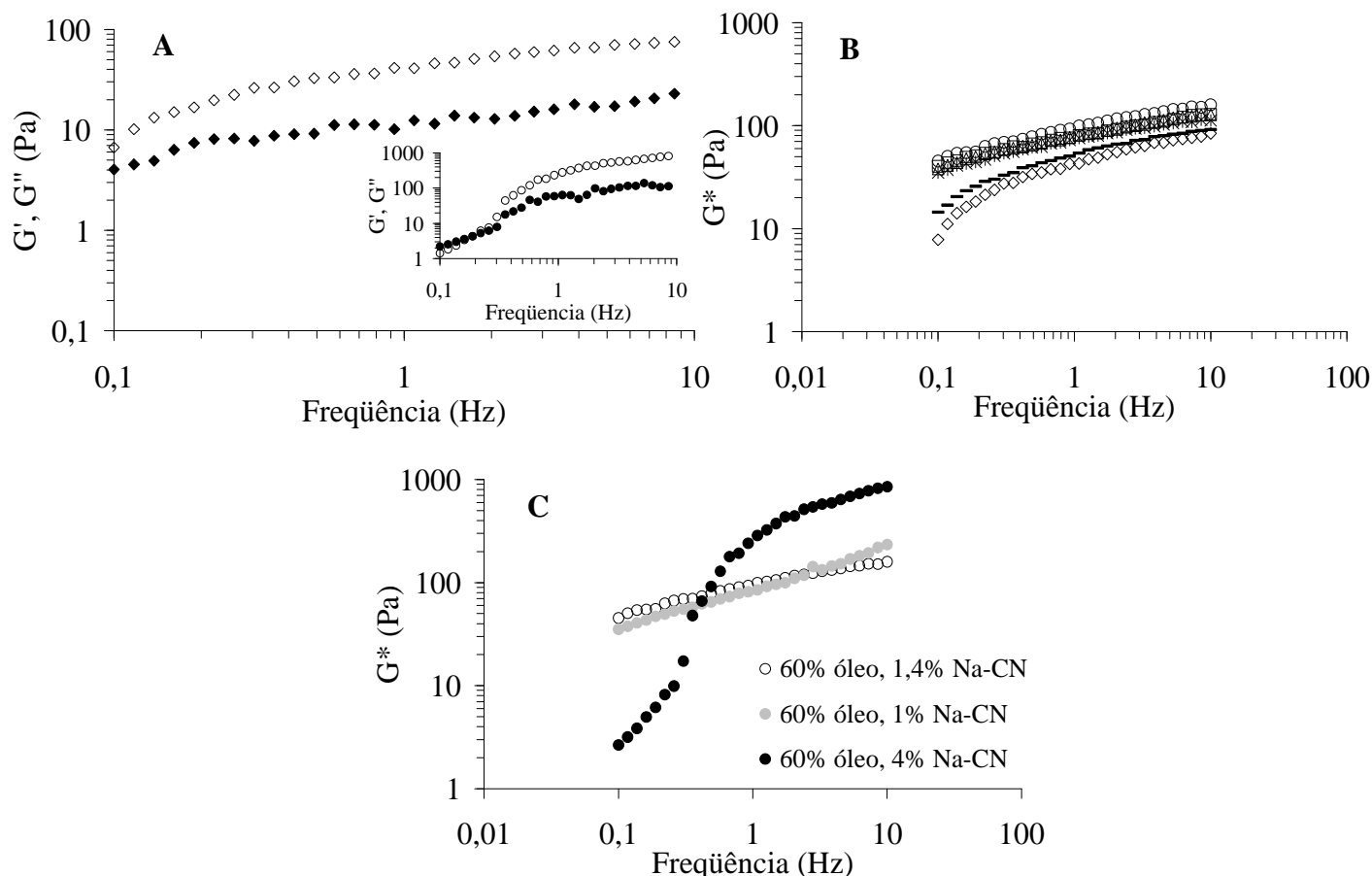
Diferentemente da fase superior, a fase inferior das emulsões se comportou como um fluido Newtoniano (Figura 4.4C). Neste tipo de comportamento, a viscosidade das amostras é constante, independente da taxa de deformação aplicada. A Tabela 4.5 apresenta a viscosidade da fase inferior das emulsões como função da concentração inicial das amostras. A partir destes resultados, pode-se observar que a viscosidade da fase inferior aumentou tanto com o aumento da concentração de proteína quanto de óleo no sistema inicial, da mesma maneira que ocorreu para a fase superior. Esse comportamento pode ser explicado pela composição química das fases separadas (Tabela 4.2), já que o aumento nas concentrações de óleo e proteína nas solução inicial resultou em maior razão proteína/água na fase inferior, levando ao aumento da viscosidade.

**Tabela 4.5.** Efeito da concentração dos ingredientes na viscosidade ( $\eta$ ) (mPa.s) da fase inferior das emulsões estabilizadas por caseinato de sódio

Óleo Na-CN	10 %	20 %	30 %	40 %	50 %	60 %
1 %	1,73 $\pm$ 0,06 <sup>Aa</sup>	1,83 $\pm$ 0,06 <sup>Aba</sup>	1,85 $\pm$ 0,07 <sup>Aba</sup>	2,00 $\pm$ 0 <sup>Ba</sup>	2,30 $\pm$ 0,14 <sup>Ca</sup>	2,40 $\pm$ 0 <sup>Ca</sup>
1,4 %	2,00 $\pm$ 0 <sup>Ab</sup>	2,05 $\pm$ 0,07 <sup>ABb</sup>	2,15 $\pm$ 0,07 <sup>Ba</sup>	2,10 $\pm$ 0 <sup>Aba</sup>	2,60 $\pm$ 0 <sup>Cb</sup>	3,0 $\pm$ 0 <sup>Db</sup>
4 %	3,87 $\pm$ 0,06 <sup>Ac</sup>	4,40 $\pm$ 0 <sup>Bc</sup>	5,10 $\pm$ 0,10 <sup>Cb</sup>	6,50 $\pm$ 0,10 <sup>Db</sup>	9,27 $\pm$ 0,06 <sup>Ec</sup>	—

Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). Letras maiúsculas: diferenças entre as concentrações de óleo para uma concentração fixa de caseinato. Letras minúsculas: diferenças entre as concentrações de proteína para uma mesma concentração de óleo.

As medidas reológicas dinâmicas da fase superior estão apresentadas na Figura 4.5. Essas propriedades não foram determinadas para a fase inferior pois essas soluções apresentaram comportamento Newtoniano.



**Figura 4.5.** Propriedades reológicas dinâmicas da fase superior das emulsões O/A estabilizadas por 1,4 % (m/v) Na-CN com diferentes concentrações de óleo. Variação do A) módulo elástico ( $G'$ ) (símbolos abertos) e módulo viscoso ( $G''$ ) (símbolos fechados) com a frequência (no detalhe o comportamento da emulsão composta por 4 % (m/v) Na-CN e 60 % (v/v) óleo), B) módulo complexo ( $G^*$ ) com a frequência para diferentes concentrações de óleo e C) módulo complexo ( $G^*$ ) com a frequência para diferentes concentrações de proteína. Concentração de óleo: ( $\diamond$ ) 10 %, ( $-$ ) 20 %, ( $\times$ ) 30 %, ( $\square$ ) 40 %, ( $\triangle$ ) 50 % e ( $\circ$ ) 60 % (v/v).

As medidas reológicas dinâmicas da fase superior das emulsões indicaram que todos os sistemas apresentaram comportamento de solução concentrada ( $G'$  maior do que  $G''$  ao longo de toda a frequência), como mostra o exemplo na Figura 4.5A, com exceção da emulsão que não separou de fases (4 % m/v Na-CN e 60 % v/v óleo) que apresentou um comportamento diferente (detalhe da Figura 4.5A). Neste último caso,  $G''$  foi maior do que  $G'$  em baixas frequências e estes dois módulos se cruzaram em  $\sim 0,2$  Hz, sendo esta solução classificada como semi-diluída. As curvas de  $G'$  e  $G''$  em função da frequência referentes às outras

amostras estão apresentadas no Anexo 3. A partir destes resultados, verificou-se que o comportamento viscoelástico dos sistemas instáveis, juntamente com sua pseudoplasticidade, indicaram a presença de estrutura composta por uma rede elástica frágil (TORRES *et al.*, 2007).

A influência das concentrações de óleo e proteína nas curvas de módulo complexo ( $G^*$ ) está apresentada nas Figuras 4.5B e 4.5C, respectivamente. A partir destes gráficos, tem-se que o aumento na concentração de óleo na solução inicial (para um mesmo teor de proteína) levou a maiores valores de  $G^*$  das fases superiores, o que representou a formação de uma rede mais forte. Em relação ao teor de proteína, tem-se que o aumento da concentração de caseinato de sódio de 1 % para 1,4 % (m/v) no sistema inicial praticamente não alterou os valores de  $G^*$  ao longo da frequência. No entanto, quando a concentração de proteína aumentou para 4 % (m/v), e concentração de óleo foi mantida em 60 % (v/v), os valores de  $G^*$  se tornaram mais dependentes da frequência. Isso ocorreu pois, neste caso específico, a emulsão composta por 4 % (m/v) Na-CN e 60 % (v/v) óleo não apresentou separação de fases, o que resultou em uma maior concentração relativa de água na emulsão, tornando-a menos estruturada. Esse fato pode ser comprovado através da análise química dos sistemas (Tabela 4.2), já que este exibiu uma razão óleo/água muito menor do que as outras amostras. A composição dessa emulsão também explica a sua classificação como fluido semi-diluído (Figura 4.5A).

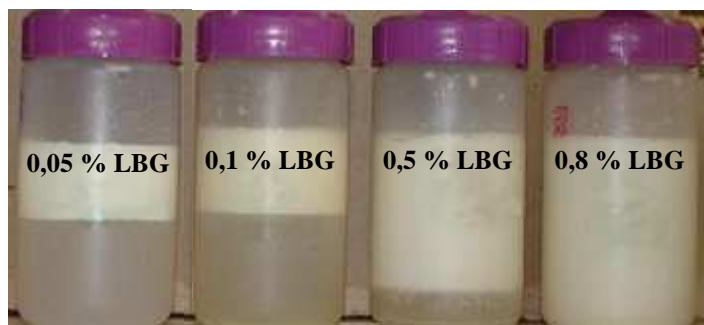
Comparando os resultados de estabilidade, composição das fases, tamanho das gotas e propriedades reológicas das emulsões, pode-se observar que o aumento no conteúdo de óleo e proteína na solução inicial resultou na diminuição do nível de separação de fases com a formação de fases superiores e inferiores mais viscosas e com menores tamanhos de gotas. O efeito da concentração de óleo nas propriedades das emulsões foi atribuído ao aumento da viscosidade das soluções iniciais, o que dificultou a interação entre as gotas de óleo e sua coalescência. Por outro lado, a influência da concentração de proteína foi associada com a cobertura da superfície das gotas, já que os sistemas com menores concentrações de caseinato de sódio (1 % e 1,4 % m/v) não continham proteína suficiente para recobrir toda a superfície das gotas de óleo, resultando na coalescência. Entretanto, a adição de 4 % (m/v) Na-CN aumentou a cobertura das gotas promovendo maior estabilização estérica / eletrostática dos sistemas (DICKINSON *et al.*, 1997; FANG & DALGLEISH, 1993). Diferentemente do que era esperado, essa quantidade de proteína não foi suficiente para induzir a desestabilização dos



sistemas pelo mecanismo de floculação por depleção. Isso ocorreu, pois as emulsões formadas no presente trabalho apresentaram gotas com diâmetro médio cerca de 35 vezes maior do que aquele observado por Moschakis et al. (2005), que observou gotas com diâmetro médio superficial de 0.35  $\mu\text{m}$ , sendo necessária concentração de proteína superior a 1,4 % para recobrir a superfície das gotas e, conseqüentemente, resultando em menor concentração de proteína não-adsorvida no meio aquoso.

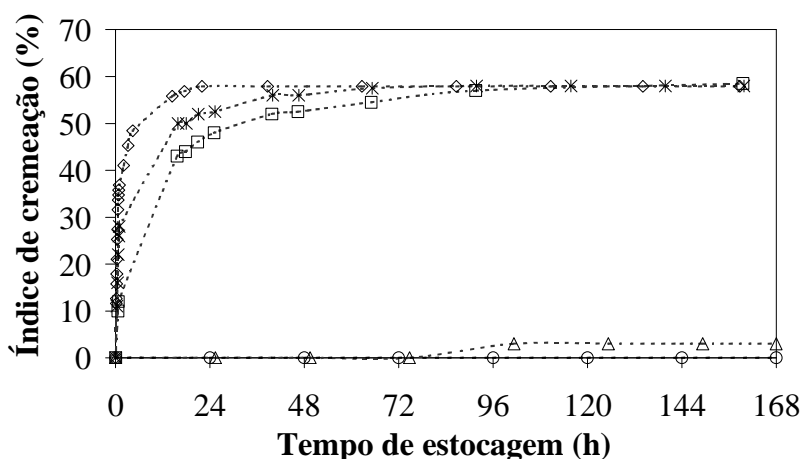
#### 4.1.2. Efeito da adição de LBG

Para a avaliação da influência da adição de LBG nas propriedades das emulsões O/A estabilizadas por caseinato de sódio, foram estudados sistemas contendo concentrações fixas de óleo (30 % v/v) e de caseinato de sódio (1 % m/v), porém variando a concentração de LBG (0,05, 0,1, 0,5 e 0,8 % m/v). A Figura 4.6 apresenta o aspecto visual destas emulsões após 7 dias de estocagem, quando as mesmas encontravam-se em equilíbrio cinético. A partir das inspeções visuais observou-se que as amostras contendo 0,05 % ou 0,1 % (m/v) LBG apresentaram separação de fases bastante evidente, assim como a amostra sem adição de LBG. Já a emulsão contendo 0,5 % (m/v) LBG apresentou separação de fases menos acentuada, com a formação de uma pequena fase inferior, enquanto a adição de 0,8 % de LBG promoveu a estabilização da emulsão, de modo que estas não apresentaram separação de fases, mesmo após 7 dias de estocagem. Emulsões estabilizadas por caseinato de sódio na presença de goma guar, uma galactomanana como a goma jataí, também se tornaram estáveis após a adição de uma determinada concentração de polissacarídeo (NEIRYNCK et al., 2007). No caso da guar, foi necessária a adição de 1 % (em massa) de polissacarídeo para a estabilização de uma emulsão composta por 25 % (em massa) de óleo de soja e 0,3 % (em massa) de caseinato de sódio.



**Figura 4.6.** Aspecto visual das emulsões óleo-água contendo 1 % (m/v) de caseinato de sódio, 30 % (v/v) de óleo e concentração de LBG de 0,05, 0,1, 0,5 e 0,8 % (m/v).

A partir da observação da separação de fases com o tempo, pode-se notar que o processo de cremação ocorreu nas primeiras horas após o preparo das emulsões, da mesma maneira observada para as emulsões estabilizadas apenas por caseinato de sódio. A Figura 4.7 apresenta a variação do índice de cremação das emulsões com o tempo de estocagem das mesmas. Emulsões sem adição de LBG (0 %) e contendo baixas concentrações de polissacarídeo (0,05 e 0,1 % m/v) exibiram um índice de cremação similar após cerca de 4 dias de estocagem. Entretanto, a taxa de cremação destes sistemas foi diferente, sendo o processo de separação de fases mais rápido para emulsões contendo menores concentrações de polissacarídeo. A mesma tendência foi observada para emulsões contendo maiores concentrações de LBG (0,5 e 0,8 % m/v), sendo esse fato provavelmente associado à maior viscosidade dos sistemas iniciais, que contêm maiores concentrações de polissacarídeo.



**Figura 4.7.** Efeito da concentração de LBG no índice de cremação das emulsões estabilizadas por 1 % (m/v) de caseinato de sódio contendo 30 % (v/v) de óleo. Concentração de LBG: (◇) 0 %, (✱) 0,05 %, (□) 0,1 %, (△) 0,5 % e (○) 0,8 % (m/v).

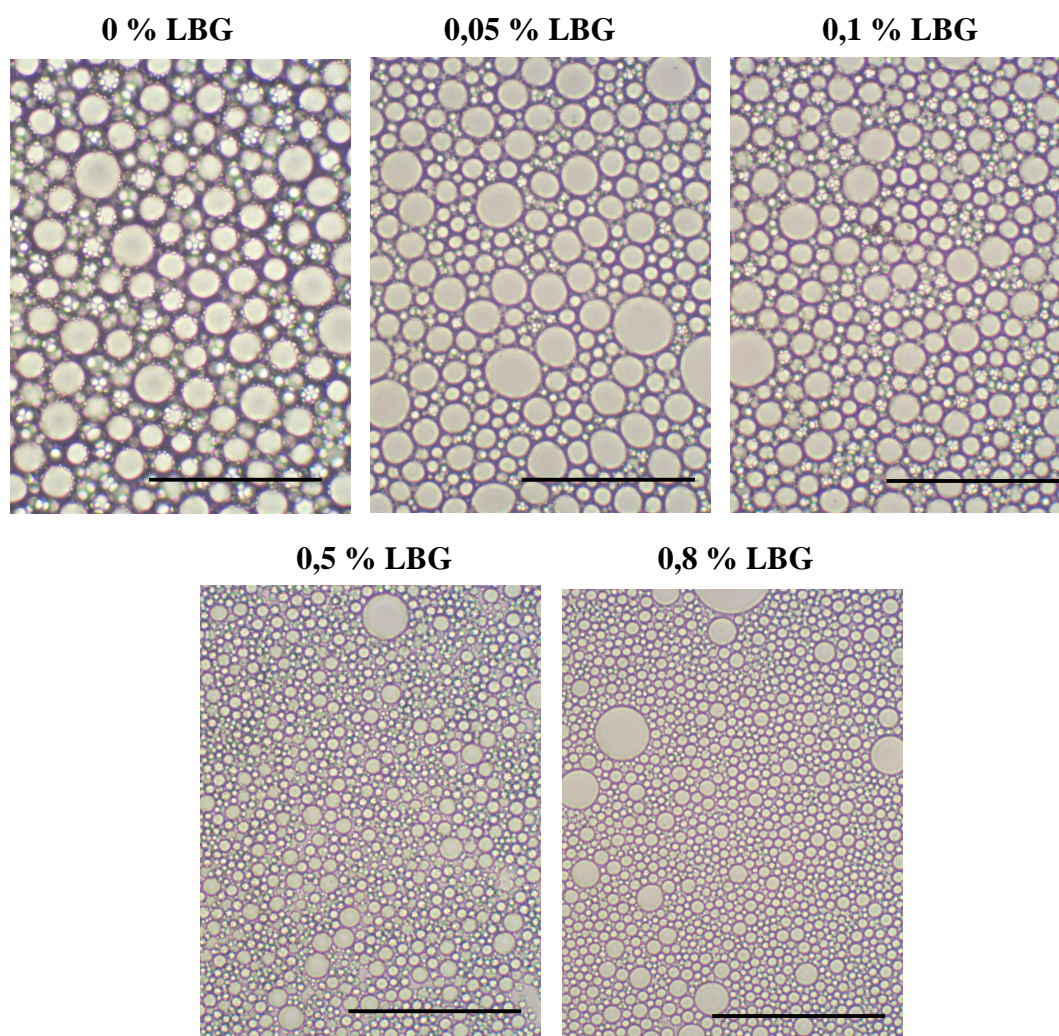
A composição química das fases separadas foi determinada após 7 dias de estocagem (Tabela 4.6) e o balanço de massa dos sistemas (Equações 3 e 4) foi realizado para confirmação dos resultados obtidos. A partir da análise química foi possível observar que o aumento da concentração de LBG na solução inicial levou ao aumento das concentrações de proteína e polissacarídeo e a diminuição no conteúdo de óleo de ambas as fases, com exceção da amostra contendo 0,5 % (m/v) LBG que apresentou um maior teor de óleo na fase inferior. Além disso, pode-se notar que o aumento na concentração de LBG na solução inicial levou a um aumento da razão proteína/componente dominante na fase, ou seja, razão proteína/óleo para a fase superior e razão proteína/água para a fase inferior. Assim, da mesma maneira que no item anterior (item 4.1.1), quanto maior é a razão proteína/componente dominante na fase, maior a estabilidade do sistema.

**Tabela 4.6.** Composição química das fases separadas de emulsões estabilizadas por 1 % (m/v) de caseinato de sódio com adição de LBG

LBG <sub>inicial</sub> (%)	Fase superior				
	Proteína (%)	Água (%)	Óleo (%)	Polissacarídeo (%)	Razão prot/óleo · 10 <sup>-3</sup>
0	0,48 ± 0,08	26,50 ± 0,01	73,03 ± 0,08	0	6,57
0,05	0,45 ± 0,06	28,16 ± 0,11	71,35 ± 0,13	0,04 ± 0,02	6,31
0,1	0,50 ± 0,08	28,91 ± 0,06	70,49 ± 0,10	0,10 ± 0,01	7,09
0,5	0,79 ± 0,04	59,15 ± 1,16	39,56 ± 1,16	0,50 ± 0,01	19,97
0,8	0,91 ± 0,06	70,25 ± 0,16	28,05 ± 0,17	0,80 ± 0,03	32,44
	Fase inferior				
	Proteína (%)	Água (%)	Óleo (%)	Polissacarídeo (%)	Razão prot/água · 10 <sup>-3</sup>
0	0,82 ± 0,10	98,13 ± 0,07	1,05 ± 0,12	0	8,36
0,05	1,05 ± 0,04	98,37 ± 0,11	0,52 ± 0,12	0,06 ± 0,01	10,67
0,1	1,06 ± 0,02	98,35 ± 0,12	0,49 ± 0,12	0,11 ± 0,01	10,77
0,5	1,79 ± 0,49	96,71 ± 1,79	1,05 ± 0,19	0,45 ± 0,04	18,51
0,8	—	—	—	—	—

A Figura 4.8 apresenta a microestrutura da fase superior das emulsões O/A contendo 1 % (m/v) de caseinato de sódio, 30 % (v/v) de óleo e variadas concentrações de LBG (0 % a 0,8 % m/v). A partir da observação das imagens de microscopia, verificou-se que as emulsões apresentam estrutura bastante homogênea, com gotas individuais uniformemente distribuídas,

sem sinal de floculação. Além disso, pode-se observar claramente que ocorreu diminuição no tamanho das gotas com o aumento da concentração de polissacarídeo. No entanto, novamente foram realizadas análises de imagem a fim de se determinar de maneira mais precisa o efeito da adição do polissacarídeo no tamanho das gotas. Os valores encontrados para o diâmetro médio superficial das gotas estão apresentados na Tabela 4.7.



**Figura 4.8.** Microestruturas de emulsões O/A com 1 % (m/v) de caseinato de sódio, 30 % (v/v) de óleo e concentração de LBG de 0, 0,01 %, 0,05 %, 0,1 %, 0,5 % e 0,8 % (m/v). Barra de escala = 100 μm.

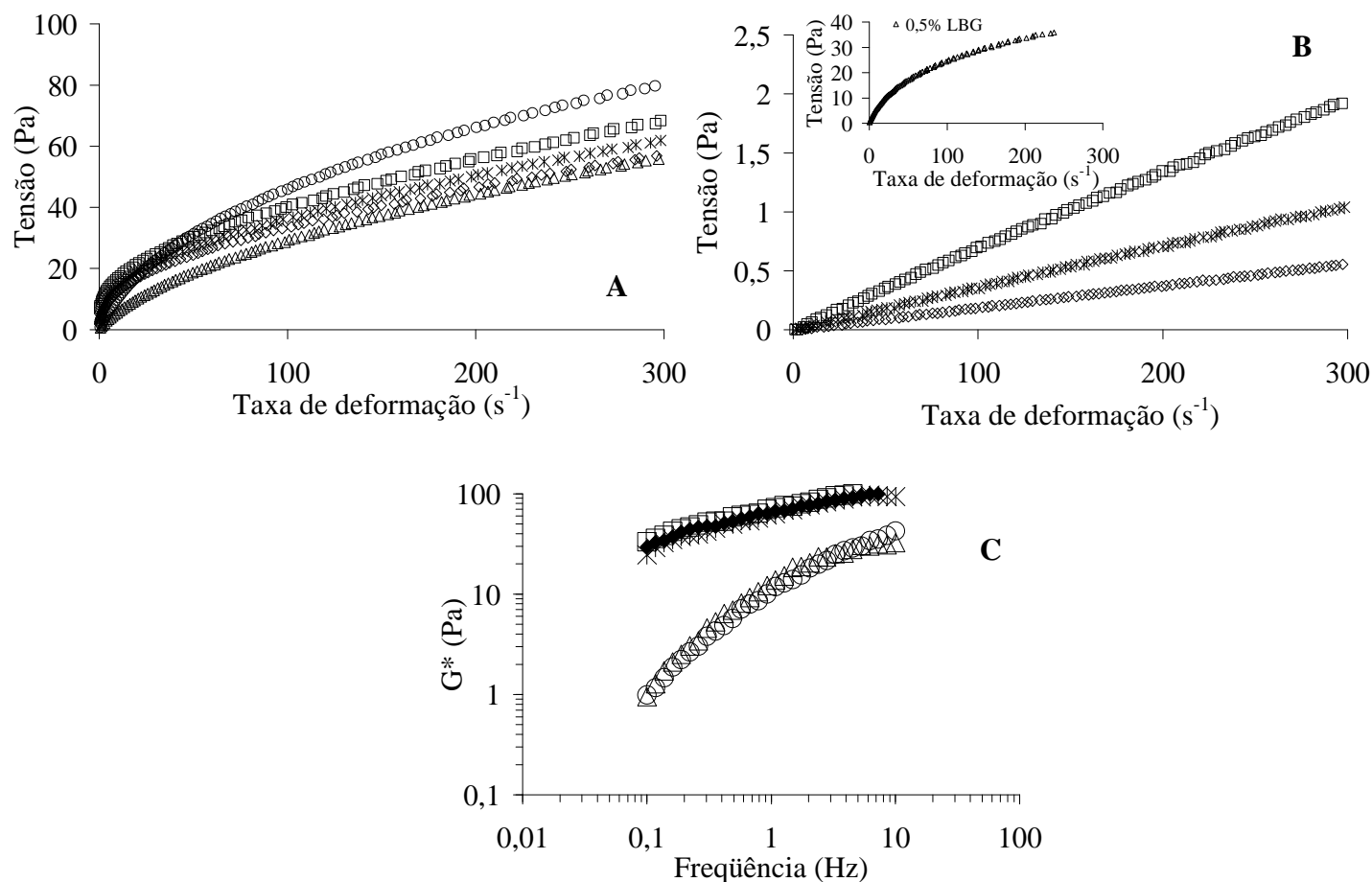
**Tabela 4.7.** Valores de diâmetro médio superficial das gotas ( $d_{32}$ ) ( $\mu\text{m}$ ) para emulsões estabilizadas por 1% de caseinato de sódio e diferentes concentrações de LBG

Concentração de LBG (m/v)	Diâmetro médio das gotas $d_{32}$ ( $\mu\text{m}$ )
0	$14,41 \pm 0,41^{\text{A}}$
0,05 %	$13,90 \pm 1,37^{\text{A}}$
0,1 %	$11,84 \pm 0,60^{\text{B}}$
0,5 %	$6,48 \pm 0,29^{\text{C}}$
0,8 %	$6,32 \pm 0,30^{\text{C}}$

Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ )

Analisando-se a Tabela 4.7, verifica-se que a adição de uma pequena quantidade de LBG (0,05 % m/v) não foi suficiente para alterar o tamanho das gotas das emulsões, o que está de acordo com os dados de estabilidade apresentados na Figura 4.7. Entretanto, as emulsões contendo 0,1 % (m/v) de LBG na solução inicial apresentaram tamanho de gotas significativamente menor do que aquele observado para as emulsões sem adição de polissacarídeo, embora essa redução não tenha sido suficiente para diminuir o nível de cremação do sistema (Figura 4.7). Já as emulsões contendo altas concentrações de LBG (0,5 % e 0,8 % m/v) apresentaram gotas com diâmetro aproximadamente metade daquele observado para emulsões sem adição de LBG, resultando em uma maior estabilidade destas amostras. Comparando o tamanho de gotas destas emulsões com aquelas estabilizadas apenas por caseinato de sódio, observou-se que a amostra contendo 0,8 % de LBG apresenta tamanho de gotas similar àquela contendo 4 % de proteína e 60 % de óleo (Tabela 4.3), sendo ambas estáveis à cremação por até 7 dias.

O efeito da adição de LBG na estabilidade das emulsões pode ser melhor entendido através do estudo da reologia das emulsões. A Figura 4.9 apresenta o comportamento reológico das emulsões contendo 1 % (m/v) de caseinato de sódio, 30 % (v/v) óleo e diferentes concentrações de LBG (0 % a 0,8 % m/v).



**Figura 4.9.** Efeito da concentração de LBG (% m/v) nas propriedades reológicas das emulsões estabilizadas por 1 % (m/v) caseinato de sódio contendo 30 % (v/v) de óleo. A) Curva de escoamento da fase superior das amostras, B) curvas de escoamento da fase inferior das amostras (no detalhe a curva de escoamento da fase inferior da emulsão adicionada de 0,5 % LBG na solução inicial) e C) módulo complexo ( $G^*$ ) da fase superior. Concentração de LBG: ( $\diamond$ ) 0 %, ( $\times$ ) 0,05 %, ( $\square$ ) 0,1 %, ( $\triangle$ ) 0,5 % e ( $\circ$ ) 0,8 % (m/v).

A Figura 4.9A apresenta as curvas de escoamento da fase superior das emulsões contendo diferentes concentrações de polissacarídeo. As amostras com baixas concentrações de LBG (0,05 e 0,1 % m/v) apresentaram um comportamento de fluido Herschel-Bulkley (HB), da mesma maneira que as emulsões sem adição de polissacarídeo, enquanto que as emulsões com alto conteúdo de LBG (0,5 e 0,8 % m/v) se comportaram como fluidos pseudoplásticos sem o aparecimento de tensão residual. Diferentemente da fase superior, a fase inferior das emulsões se comportou como fluido Newtoniano, com exceção da amostra contendo 0,5 % (m/v) de LBG, que apresentou um comportamento que segue a Lei da

Potência (Figura 4.9B), e da emulsão formada por 0,8 % (m/v), que não apresentou separação de fases.

Os valores de índice de consistência ( $k$ ), índice de comportamento ( $n$ ), tensão residual ( $\sigma_0$ ) e viscosidade aparente a uma taxa de deformação de  $100 \text{ s}^{-1}$  estão apresentados na Tabela 4.8. Para sistemas com até 0,1 % (m/v) LBG, nenhuma diferença significativa foi observada para os valores de  $k$  ( $p < 0,05$ ), enquanto que os valores de  $n$  e  $\sigma_0$  tenderam a aumentar conforme maiores concentrações de LBG foram adicionados ao sistema. Como  $n$  foi menor que 1 para todas as amostras, tem-se que o comportamento pseudoplástico se tornou mais pronunciado com a diminuição do conteúdo de LBG. Adicionalmente, a viscosidade de ambas as fases, sob uma taxa de deformação de  $100 \text{ s}^{-1}$ , tendeu a aumentar com a elevação da concentração de polissacarídeo. Neiryck et al. (2007) observaram a mesma tendência para emulsões O/A estabilizadas por caseinato de sódio e goma guar. Entretanto, o aumento na concentração de LBG para 0,5 % (m/v) levou a um comportamento incomum das emulsões, já que a viscosidade da fase superior diminuiu em relação aos outros sistemas, enquanto que sua fase inferior apresentou o maior valor de viscosidade a  $100 \text{ s}^{-1}$ . Esse comportamento diferenciado pode ser explicado pela composição das fases separadas (Tabela 4.6), já que a fase superior desta emulsão apresentou maior concentração de água do que as outras amostras, enquanto que a fase inferior apresentou uma maior razão proteína/água e uma concentração de polissacarídeo e de óleo muito maior do que a fase inferior das outras emulsões. No entanto, esse efeito não foi observado para as emulsões contendo 0,8 % (m/v) LBG, já que a viscosidade desta solução inicial foi alta o suficiente para impedir o processo de separação de fases.

As medidas reológicas dinâmicas da fase superior das emulsões (Figura 4.9C) mostraram que a estrutura dos sistemas contendo baixas concentrações de LBG (0,05 e 0,1 % m/v) é similar à estrutura das amostras formadas sem a adição de polissacarídeo. Pode-se também observar que a fase superior destas amostras é mais estruturada do que aquelas que contém maiores concentrações de LBG (0,5 e 0,8 % m/v), já que apresentaram maiores valores de  $G^*$  ao longo de toda a frequência estudada. Além disso, as emulsões compostas por 0,5 e 0,8 % (m/v) de LBG também apresentaram fases superiores com estruturas similares. A explicação para o comportamento dessas amostras novamente encontra-se na composição das fases separadas (Tabela 4.6), já que a fase superior desses dois sistemas apresentou maior

conteúdo de água relativo, levando à formação de uma estrutura menos complexa e elástica, resultando em uma maior dependência da frequência e menores valores de  $G'$ .

**Tabela 4.8.** Efeito da concentração de LBG no índice de consistência ( $k$ ), índice de comportamento ( $n$ ), tensão residual ( $\sigma_o$ ) e viscosidade ( $\eta$ ) a  $100 \text{ s}^{-1}$  das emulsões contendo 1 % Na-CN (m/v) e 30 % óleo (v/v)

LBG (% m/v)	Fase superior			Fase inferior	
	$k \text{ (Pa.s}^n\text{)}$	$n$	$\sigma_o \text{ (Pa)}$	$\eta_{100} \text{ (Pa.s)}$	$\eta_{100} \text{ (Pa.s)}$
0	3,08 <sup>A</sup>	0,50 <sup>A</sup>	1,57 <sup>A</sup>	0,33 <sup>AE</sup>	0,0019 <sup>A</sup>
0,05	2,96 <sup>A</sup>	0,52 <sup>AB</sup>	2,93 <sup>A</sup>	0,36 <sup>AC</sup>	0,0035 <sup>A</sup>
0,1	2,92 <sup>A</sup>	0,53 <sup>B</sup>	6,35 <sup>B</sup>	0,41 <sup>BCD</sup>	0,0066 <sup>A</sup>
0,5	1,54 <sup>B</sup>	0,63 <sup>C</sup>	—	0,28 <sup>E</sup>	0,2384 <sup>B</sup>
0,8	3,40 <sup>A</sup>	0,56 <sup>D</sup>	—	0,44 <sup>D</sup>	—

Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) na mesma coluna.

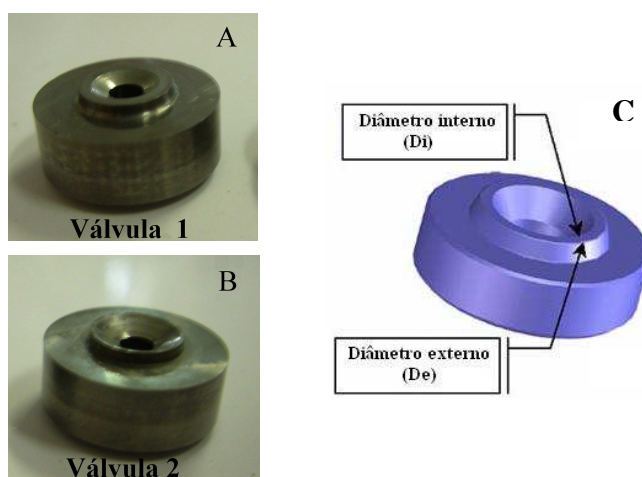
Os resultados obtidos para este tipo de sistema revelaram que, apesar das amostras contendo maiores concentrações de LBG (0,5 e 0,8 % m/v) não apresentarem tensão residual, estas foram mais estáveis do que aquelas com menor teor de polissacarídeo (Figura 4.7). Isso provavelmente ocorreu devido à alta viscosidade das soluções iniciais, o que diminui a mobilidade das gotas de óleo e favorece a formação de pequenas gotículas (Tabela 4.7). Assim, essas emulsões apresentam menor migração de óleo para a fase superior, resultando em menor viscosidade desta fase, e com valor similar desta propriedade reológica para a fase inferior.

#### 4.1.3. Efeito da pressão na homogeneização das emulsões

Para a avaliação da influência da pressão na estabilidade das emulsões O/A, novamente foi utilizado o sistema composto por 1 % (m/v) de caseinato de sódio e 30 % (v/v) de óleo, da mesma maneira que no item 4.1.2. Nesta parte do trabalho, este sistema foi preparado em duas etapas de homogeneização: primária e secundária. A etapa de homogeneização primária correspondeu à mesma utilizada para a produção dos outros tipos de emulsão (itens 4.1.1 e 4.1.2), em que os ingredientes foram misturados utilizando-se um triturador – misturador tipo “Ultra Turrax” a 14000 rpm por 4 minutos. Já na homogeneização secundária, foi utilizado um homogeneizador de dois estágios, sendo que a pressão no primeiro estágio variou entre 100 e



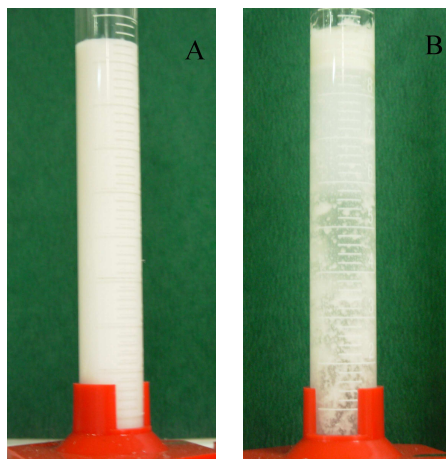
600 bar e no segundo estágio foi de 50 bar. Neste caso, uma alta energia foi fornecida aos sistemas, resultando em uma grande diminuição do tamanho das gotas. Neste processo de homogeneização, o fluido passa através de uma estreita abertura na válvula de homogeneização, criando condições de alta turbulência e cisalhamento, combinadas com compressão, aceleração, pressão e impacto. Neste estudo foram testados dois diferentes tipos de válvulas (Figura 4.10), sendo que a válvula 1 (Figura 4.10A) produz menor cisalhamento das amostras, enquanto que a válvula 2 (Figura 4.10B) foi desenvolvida especificamente para aplicação de alta pressão em emulsões. A diferença entre as válvulas está na distância entre os diâmetros interno e externo (Figura 10C), sendo esta maior para a válvula 1. Como essa distância representa a área de cisalhamento das amostras, e a força aplicada depende da abertura da válvula, tem-se que quanto menor a distância entre os diâmetros, maior é o cisalhamento da amostra.



**Figura 4.10.** Diferentes tipos de válvulas utilizadas no processo de homogeneização das emulsões. A) válvula que produz menor cisalhamento, B) válvula específica para a aplicação de altas pressões em emulsões e C) representação esquemática das válvulas.

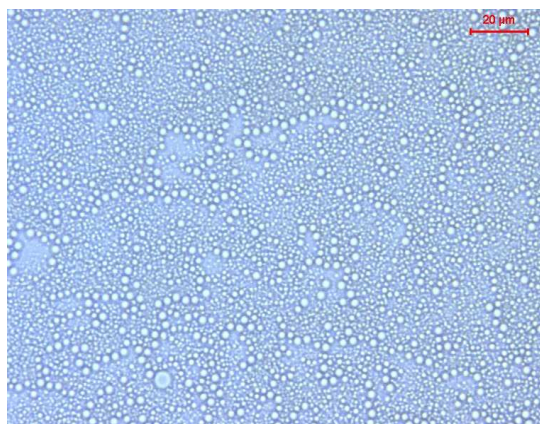
A partir da inspeção visual das amostras, observou-se que, após a homogeneização secundária, nenhuma emulsão apresentou separação de fases até 7 dias de estocagem. O aspecto visual da emulsão estabilizada a 100 bar utilizando-se a válvula 1 está apresentado na Figura 4.11A, sendo que as amostras homogeneizadas sob diferentes condições apresentaram aparência similar. Visualmente, estas emulsões apresentaram características muito diferentes quando comparadas com aquelas estabilizadas apenas pela homogeneização primária, pois sua

aparência era mais esbranquiçada e mais fluida, com aspecto semelhante ao leite. Já a Figura 4.11B apresenta a aparência visual de uma emulsão O/A também homogeneizada a 100 bar, porém sem a adição de proteína como emulsificante. Neste caso, pode-se notar claramente que a emulsão desestabilizou-se devido à ausência do emulsificante, porém não ocorreu completa separação dos dois componentes, como observado nos sistemas que passaram apenas por homogeneização primária.



**Figura 4.11.** Aspecto visual das emulsões homogeneizadas a 100 bar de pressão utilizando-se a válvula 1. A) Emulsão composta por 1 % (m/v) Na-CN e 30 % (v/v) óleo e B) emulsão O/A (30 % v/v óleo) sem adição de emulsificante.

A microestrutura referente ao sistema composto por 1 % (m/v) Na-CN e 30 % (v/v) óleo, homogeneizado a 100 bar utilizando-se a válvula 1, pode ser observada na Figura 4.12.



**Figura 4.12.** Microestrutura da emulsão composta por 1 % (m/v) Na-CN e 30 % (v/v) óleo homogeneizada a 100 bar de pressão utilizando-se a válvula 1. Barra da escala = 20  $\mu\text{m}$ .

A partir da imagem de microscopia apresentada na Figura 4.12 pode-se observar que as gotas de óleo presentes nesse sistema foram menores que nas outras emulsões estudadas (itens 4.1.1 e 4.1.2), tornando muito difícil a realização das análises de imagens. Os sistemas produzidos sob as outras condições de homogeneização apresentaram microestrutura bastante similar, não havendo diferença visual entre o tamanho das gotas. Para a determinação do tamanho médio das gotas pertencentes a esses sistemas, foi utilizada a técnica de espalhamento de luz e, como estas emulsões mostraram-se bastante estáveis, não existiram problemas de desestabilização das amostras no momento em que estas foram diluídas em água.

A Tabela 4.9 apresenta os valores de diâmetro médio superficial ( $d_{32}$ ) obtidos através da técnica de espalhamento de luz para as emulsões homogeneizadas sob diferentes pressões utilizando-se as duas diferentes válvulas.

**Tabela 4.9.** Efeito da aplicação de pressão no diâmetro médio das gotas ( $d_{32}$ ) ( $\mu\text{m}$ ) das emulsões contendo 1 % (m/v) Na-CN e 30 % (v/v) óleo

Pressão (bar)	$d_{32}$ ( $\mu\text{m}$ )	
	Válvula 1	Válvula 2
100	1,35 <sup>Aa</sup>	1,50 <sup>Ab</sup>
200	0,70 <sup>Ba</sup>	0,67 <sup>Bb</sup>
300	0,49 <sup>Ca</sup>	0,50 <sup>Cb</sup>
400	0,42 <sup>Da</sup>	0,45 <sup>Db</sup>
500	0,41 <sup>Da</sup>	0,41 <sup>Ea</sup>
600	0,41 <sup>Da</sup>	0,39 <sup>Fb</sup>

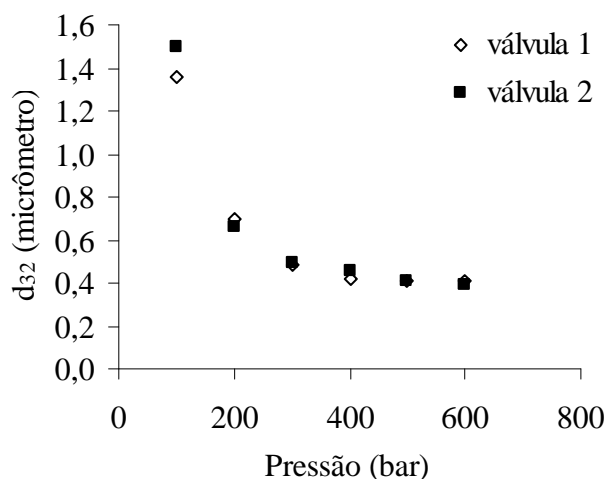
Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

Letras maiúsculas: diferenças entre as pressões. Letras minúsculas: diferenças entre as válvulas.

A partir destes dados, pode-se observar que as emulsões homogeneizadas a alta pressão apresentaram a formação de gotas com diâmetro médio superficial na faixa de 0,39  $\mu\text{m}$  a 1,50  $\mu\text{m}$ , sendo estes valores mais de cinco vezes inferiores àqueles observados para as emulsões produzidas utilizando-se apenas a homogeneização primária (Tabela 4.3). Dickinson et al. (1997) observaram a formação de gotas com diâmetro médio superficial na faixa de 0,39  $\mu\text{m}$  a 0,45  $\mu\text{m}$  para emulsões óleo-água compostas por 1 % a 6 % (em massa) de caseinato de sódio

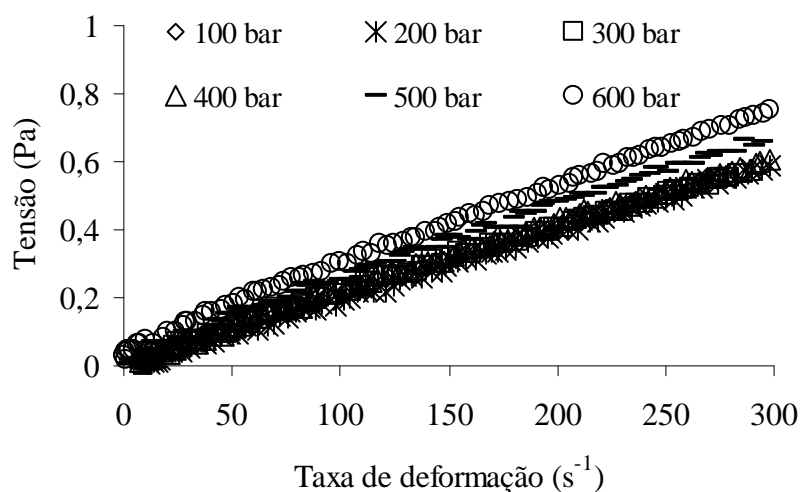
e 35 % ou 45 % (v/v) de n-tetradecano, homogeneizadas a 400 bar, sendo estes valores similares aos observados neste trabalho.

A partir dos dados da Tabela 4.9, construiu-se um gráfico relacionando a pressão de homogeneização das emulsões com o tamanho médio das gotas (Figura 4.13), podendo-se observar que o aumento na pressão de homogeneização das emulsões promoveu uma redução no tamanho das gotas. Além disso, nota-se que o tamanho médio das gotas foi pouco influenciado pelo tipo de válvula utilizado na homogeneização dos sistemas, apesar de haver diferença estatística entre eles. No entanto, estas diferenças estatísticas devem-se ao fato dos desvios entre as medidas serem muito pequenos. No caso do uso da válvula 1, a partir de 400 bar não houve mais diminuição do tamanho de gota, porém o uso da válvula 2 a maiores pressões levou a um pequeno decréscimo do diâmetro médio das gotas.



**Figura 4.13.** Variação do diâmetro médio das gotas com o aumento da pressão

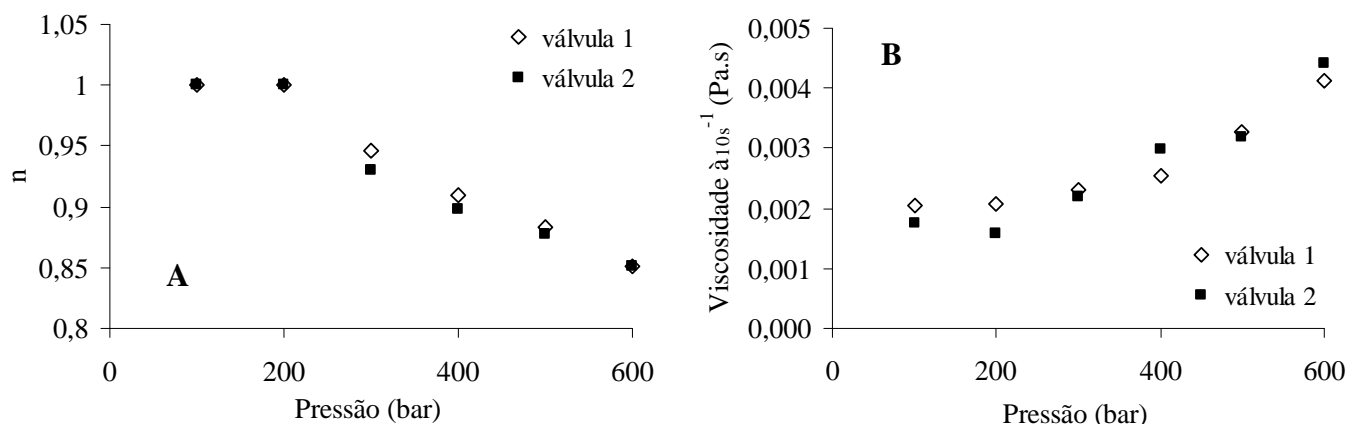
As propriedades reológicas destas emulsões foram avaliadas a fim de se obter informações a respeito das características de textura destes produtos, estabilidade e interação entre os ingredientes. Curvas de escoamento foram construídas para todas as emulsões homogeneizadas a alta pressão, estando os resultados obtidos para válvula 1 apresentados na Figura 4.14. Neste caso, não foram feitas medidas reológicas dinâmicas pois o comportamento do fluido foi muito próximo do Newtoniano (valor de  $n$  próximo a 1), como no caso da fase inferior das emulsões estudadas nos itens anteriores.



**Figura 4.14.** Efeito da pressão de homogeneização nas curvas de escoamento das emulsões O/A estabilizadas por 1 % (m/v) de caseinato de sódio e contendo 30 % (v/v) de óleo.

A partir das curvas de escoamento obtidas para as emulsões homogeneizadas a altas pressões (Figura 4.14), nota-se que o aumento da pressão de homogeneização das amostras, ocasionou uma elevação da viscosidade, bem como um leve aumento em sua pseudoplasticidade. Esta tendência foi confirmada por ajustes das curvas utilizando-se os modelos reológicos. Assim, as emulsões O/A homogeneizadas a menores pressões (100 e 200 bar) apresentaram um comportamento de fluido Newtoniano, enquanto que os sistemas homogeneizados a maiores pressões (300, 400, 500 e 600 bar) foram melhor ajustadas utilizando-se o modelo Lei da Potência (Figura 4.15). A Figura 4.15A apresenta a tendência do índice de comportamento em função da pressão de homogeneização, verificando-se que  $n$  foi igual a 1 para as baixas pressões, e menor que 1 para as maiores pressões. Já a Figura 4.15B mostra que o aumento na pressão aplicada resultou em maiores valores de viscosidade aparente das emulsões em uma taxa de deformação de  $10 \text{ s}^{-1}$ . Neste caso, a diminuição no tamanho das gotas com o aumento da pressão (Figura 4.13) provavelmente resultou em maior interação entre as gotas, levando à elevação da viscosidade dos sistemas (Figura 4.15B). Comparando estas emulsões com aquelas produzidas apenas por homogeneização primária (Tabela 4.4), observou-se que a homogeneização secundária reduziu em mais de 200 vezes o valor da viscosidade aparente. Novamente não foram observadas grandes diferenças entre as propriedades das emulsões homogeneizadas com as duas diferentes válvulas, ou seja, um

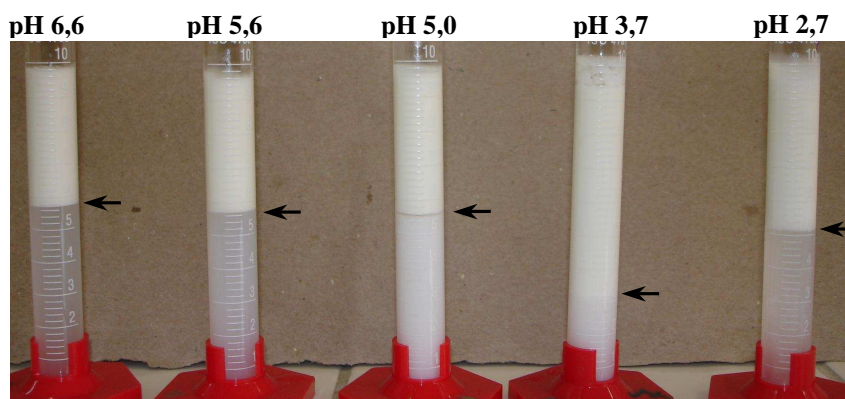
maior aumento no cisalhamento não implicou em grandes alterações de comportamento neste tipo de emulsão.



**Figura 4.15.** Efeito da pressão de homogeneização nos parâmetros reológicos das emulsões O/A estabilizadas por 1 % (m/v) de caseinato de sódio e contendo 30 % (v/v) de óleo. A) Índice de comportamento e B) viscosidade a taxa de deformação de  $10 \text{ s}^{-1}$ .

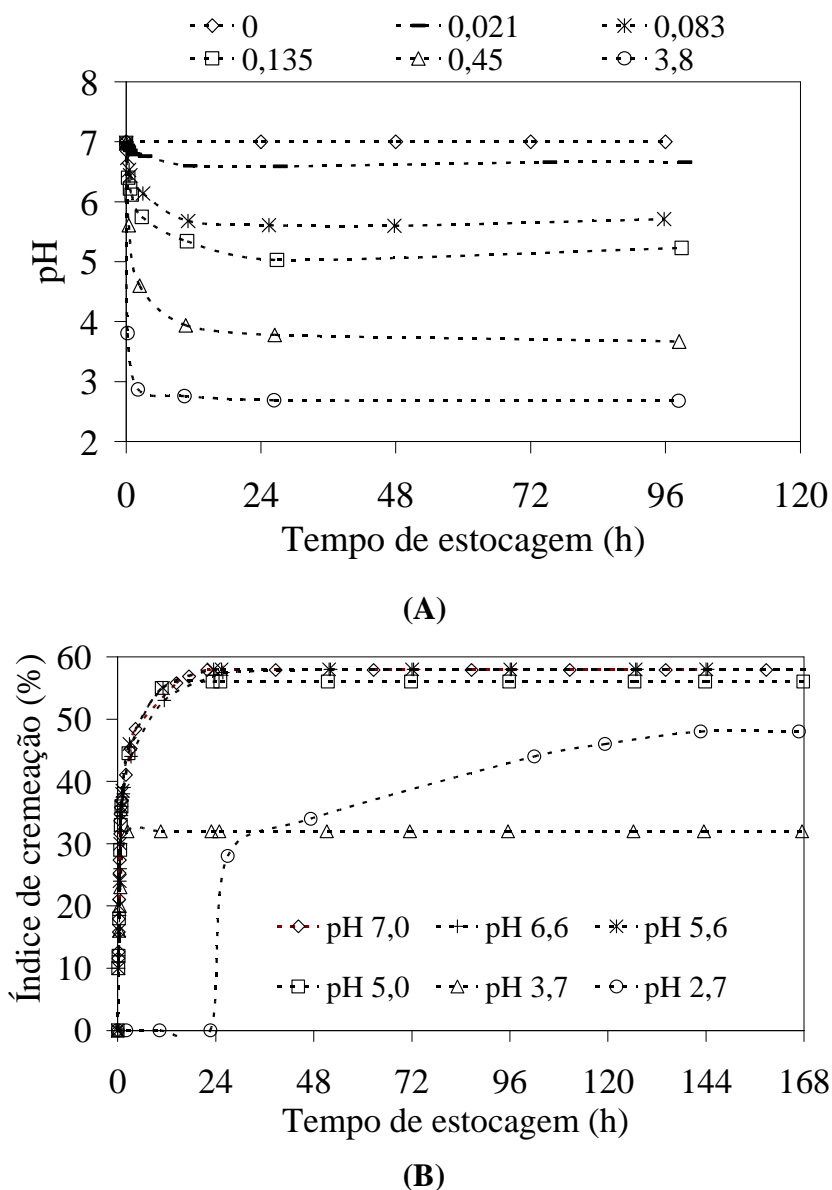
#### 4.2. INFLUÊNCIA DA VARIAÇÃO DO pH EM EMULSÕES O/A ESTABILIZADAS POR CASEINATO DE SÓDIO

Para a avaliação do efeito do processo de acidificação nas propriedades das emulsões O/A estabilizadas por caseinato de sódio, foram estudados sistemas contendo concentrações fixas de óleo (30 % v/v) e de caseinato de sódio (1 % m/v), porém com adição de diferentes razões glucona- $\delta$ -lactona (GDL)/proteína (0,021, 0,083, 0,135, 0,45 e 3,8). O aspecto visual destes sistemas após 7 dias de estocagem está apresentado na Figura 4.16.



**Figura 4.16.** Emulsões óleo-água compostas por 1 % (m/v) de caseinato de sódio, 30 % (v/v) de óleo e razões GDL/caseinato de 0,021, 0,083, 0,135, 0,45 e 3,8.

Através das observações visuais (Figura 4.16) das emulsões acidificadas sob diferentes taxas, pode-se verificar que todas as emulsões apresentaram separação de fases após estocagem a 25 °C por 7 dias. Entretanto, a fase inferior de algumas amostras apresentou-se branca e opaca, enquanto que outras mostraram-se translúcidas. A cinética de pH das emulsões, bem como o índice de cremação em função do tempo de estocagem estão apresentados na Figura 4.17.



**Figura 4.17.** Efeito da razão GDL/Na-CN: (A) nos valores de pH e (B) no índice de cremação das emulsões estabilizadas por 1 % (m/v) de caseinato de sódio e contendo 30 % (v/v) de óleo.

A hidrólise de GDL para ácido glucônico resultou em rápida redução do pH das emulsões durante as primeiras horas de estocagem, seguida por uma gradual redução até que o pH atingisse o equilíbrio após cerca de 24 horas (Figura 4.17A). Esse processo de acidificação lenta utilizando-se GDL vem sendo amplamente estudado nos últimos anos, principalmente para a produção de géis de proteína (BRAGA *et al.*, 2006; CAVALLIERI & CUNHA, 2008). O aumento na razão GDL/Na-CN levou a um aumento da taxa de acidificação e a diminuição no valor do pH final. Emulsões acidificadas com razões GDL/Na-CN de 0,021 e 0,083 alcançaram valores de pH final de 6,6 e 5,6 (acima do ponto isoelétrico do Na-CN), respectivamente. A razão GDL/Na-CN de 0,135 levou a um pH final de 5,0 (próximo ao ponto isoelétrico da  $\kappa$ -caseína), enquanto que emulsões acidificadas com razões de 0,45 e 3,8 atingiram valores de pH final de 3,7 e 2,7 (abaixo do pI), respectivamente.

Comparando os perfis de cremação (Figura 4.17B), pode-se observar que a estabilidade das emulsões foi largamente influenciada pelos valores do pH final. Perfis de cremação similares foram obtidos para emulsões com valores de pH final de 7,0, 6,6, 5,6 e 5,0, apesar da amostra com pH final 5,0 apresentar uma fase inferior gelificada e mais turva do que as outras amostras. Com a redução do pH para valores abaixo do pI (pH 3,7), observou-se diminuição da taxa de cremação, resultando em emulsões mais estáveis. No entanto, a acidificação das emulsões a um valor de pH muito abaixo do pI (pH 2,7) resultou em perfil de cremação muito distinto dos demais. Nessa condição, nenhuma separação de fases foi observada até 24 horas após a adição de GDL, quando ocorreu uma brusca separação, resultando em sistemas mais estáveis do que aqueles formados em pH neutro, porém menos estáveis do que as emulsões em pH 3,7. Nesse caso, a fase inferior tornou-se novamente transparente, como observado para os sistemas em pH 7,0, 6,6 e 5,6.

A estabilidade das emulsões depende da força de interação entre as gotas, a qual é determinada pela carga existente em sua superfície. Nas emulsões estabilizadas por proteínas, as gotas apresentam cargas negativas quando o pH está acima do pI (pHs 7,0, 6,6, 5,6 e 5,0), enquanto que um predomínio de cargas positivas pode ser observado para valores de pH < pI (pHs 3,7 e 2,7). Quando esta carga é suficientemente alta, existe repulsão eletrostática entre elas, impedindo que se agreguem. Entretanto, a diminuição do pH para valores próximos ao pI (pH 5,0) faz com que os grupos carboxílicos sejam neutralizados, passando a existir interação atrativa entre as gotas (interações hidrofóbicas, eletrostáticas e atração de van der Waals).



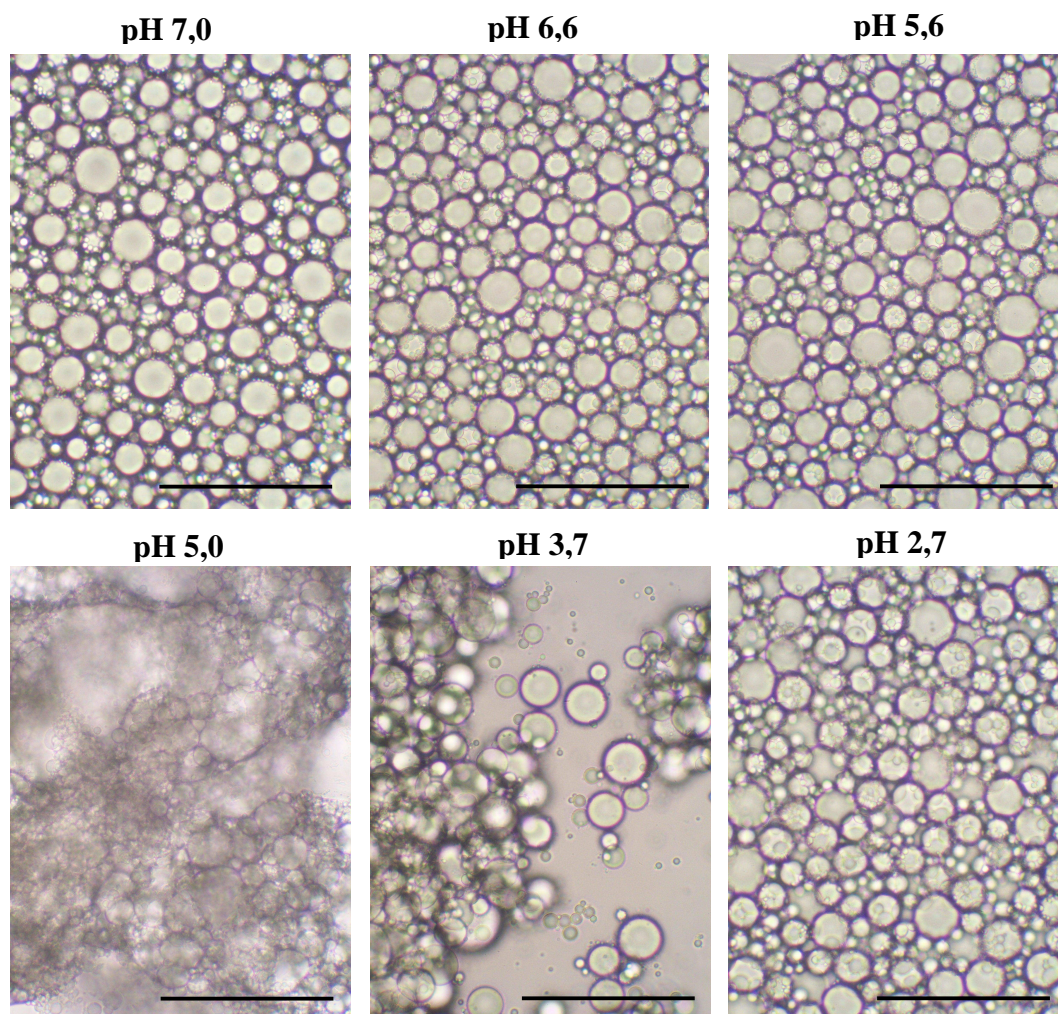
Quando essa atração é suficientemente alta, ocorre uma agregação das partículas, podendo haver a formação de uma rede tridimensional (CHEN *et al.*, 1999). Esta rede foi observada ainda em valores de pH 3,7, mostrando que nessas condições houve predomínio das interações atrativas em relação às repulsivas. Em pH 5,0 também parece haver comportamento similar, porém menos pronunciado (Figura 4.16), não afetando, assim, o índice de cremação como ocorreu em pH 3,7.

A composição química das fases separadas (Tabela 4.10) mostrou que as amostras com valores de pH 7,0, 6,6 e 5,6 eram realmente bastante similares, o que confirma os resultados de estabilidade obtidos anteriormente (Figura 4.17B). A redução no pH para 3,7 promoveu a diminuição da separação de fases, resultando em menor razão óleo/água para a fase superior, e um efeito oposto (aumento da razão óleo/água) para fase inferior das emulsões. Entretanto, quando o pH apresentou-se muito abaixo do pI (pH 2,7), a separação de fases se tornou mais pronunciada do que em pH 3,7, porém menos do que em pH neutro, o que está de acordo com a observação visual (Figura 4.16).

**Tabela 4.10.** Composição química das fases separadas das emulsões acidificadas

pH	Fase superior			
	Proteína (%)	Água (%)	Óleo (%)	Razão óleo/água
7,0	0,48 ± 0,08	26,50 ± 0,01	73,03 ± 0,08	2,76
6,6	0,26 ± 0,10	26,63 ± 0,11	73,11 ± 0,15	2,75
5,6	0,56 ± 0,06	28,30 ± 0,15	71,14 ± 0,16	2,51
5,0	0,44 ± 0,04	32,02 ± 3,48	67,54 ± 3,48	2,11
3,7	0,58 ± 0,09	44,11 ± 0,96	55,32 ± 0,96	1,25
2,7	0,64 ± 0,10	40,32 ± 0,78	59,04 ± 0,79	1,46
	Fase inferior			
	Proteína (%)	Água (%)	Óleo (%)	Razão óleo/água · 10 <sup>-3</sup>
7,0	0,82 ± 0,10	98,13 ± 0,07	1,05 ± 0,12	10,70
6,6	1,27 ± 0,05	98,14 ± 0,06	0,59 ± 0,08	6,01
5,6	1,23 ± 0,08	98,11 ± 0,15	0,66 ± 0,17	6,73
5,0	2,44 ± 0,54	96,92 ± 0,40	0,64 ± 0,67	6,60
3,7	1,26 ± 0,13	97,36 ± 0,23	1,38 ± 0,26	14,17
2,7	1,09 ± 0,06	98,31 ± 0,08	0,60 ± 0,10	6,10

A Figura 4.18 apresenta as imagens de microscopia ótica obtidas para a fase superior das emulsões acidificadas. As emulsões produzidas em valores de pH 6,6, 5,6 e 2,7 apresentaram uma microestrutura bastante similar àquela formada em pH neutro. Entretanto, a amostra com pH mais próximo ao pI (pH 5,0) apresentou estrutura bastante diferenciada, já que houve a formação de uma rede típica de gel. Apesar desta técnica de microscopia não ser adequada para a observação de géis, pode-se notar que existiu a formação de uma rede de gotas e que, provavelmente, esta foi destruída com a colocação da lamínula. Quando o pH foi decrescido para valores abaixo do pI (pH 3,7), foi possível observar que as gotas de óleo ainda formavam uma fraca rede, provavelmente porque a carga positiva predominante na superfície das mesmas não foi suficiente para impedir a sua agregação.



**Figura 4.18.** Microestruturas de emulsões O/A com 1 % de caseinato de sódio, 30 % de óleo e diferentes razões GDL/proteína: 0, 0,021, 0,083, 0,135, 0,45 e 3,8.

Novamente, o diâmetro médio superficial das gotas foi calculado através de análise de imagem (Tabela 4.11), com exceção das amostras com pH 5,0 e 3,7, cujas imagens não puderam ser analisadas devido à formação de gel.

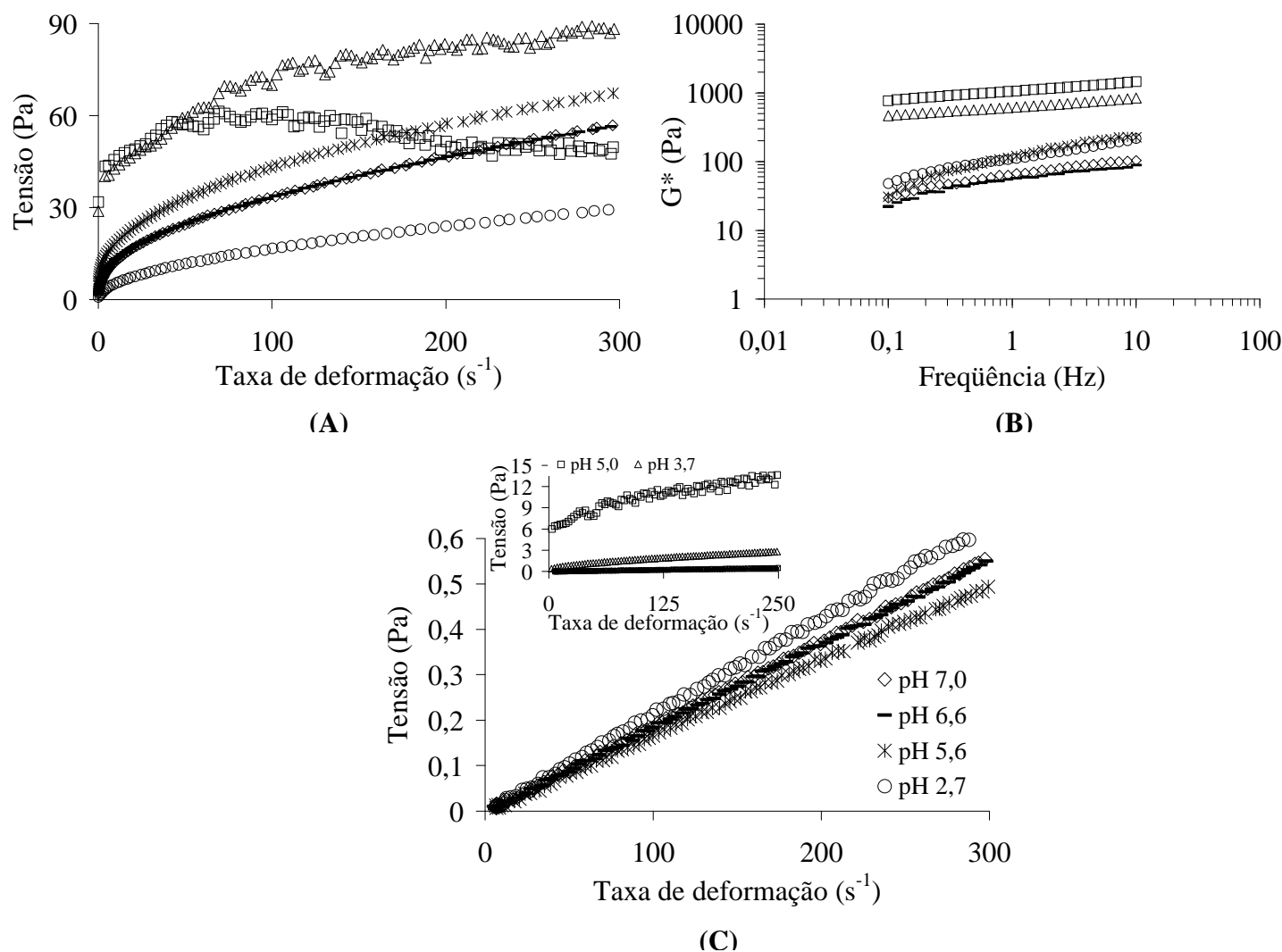
**Tabela 4.11.** Diâmetro médio superficial das gotas ( $d_{32}$ ) ( $\mu\text{m}$ ) das emulsões estabilizadas por 1 % (m/v) de caseinato de sódio, contendo 30 % (v/v) de óleo e diferentes valores de pH final

pH final	Diâmetro médio das gotas $d_{32}$ ( $\mu\text{m}$ )
7,0	$14,41 \pm 0,41^A$
6,6	$14,15 \pm 0,72^A$
5,6	$14,64 \pm 0,83^A$
5,0	–
3,7	–
2,7	$14,89 \pm 0,81^A$

Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

A partir dos valores apresentados na Tabela 4.11, observou-se que não existiram diferenças significativas entre os tamanhos das gotas com a variação do pH ( $p < 0,05$ ), o que está de acordo com as imagens de microscopia. Porém, deve-se ressaltar que apesar da emulsão com pH 2,7 exibir tamanhos de gotas similares aos encontrados para a emulsão em pH neutro, ela apresentou um índice de cremeação menor em relação às outras amostras (Figura 4.17B).

A Figura 4.19 apresenta o comportamento reológico dinâmico e em estado estacionário das emulsões acidificadas. As curvas de escoamento referentes à fase superior das emulsões (Figura 4.19A) foram ajustadas utilizando-se o modelo HB, com exceção da amostra com pH 5,0 que apresentou um comportamento diferente dos demais, provavelmente devido à formação da rede elástica. Assim, no momento em que esta emulsão foi colocada no equipamento, ocorreu uma destruição desta rede, resultando em curvas de escoamento que não puderam ser ajustadas por nenhum dos modelos reológicos. Por outro lado, a fase inferior dos sistemas apresentou um comportamento Newtoniano (Figura 4.19C), com exceção das emulsões com pHs 5,0 e 3,7 que apresentaram uma fase inferior com um comportamento que segue a Lei da potência. Os valores de viscosidade de ambas as fases em diferentes taxas de deformação estão apresentados na Tabela 4.12.



**Figura 4.19.** Medidas reológicas em estado estacionário e dinâmicas para emulsões contendo 1 % (m/v) de caseinato de sódio, 30 % (v/v) de óleo e pH variando entre 2,7 e 7,0. A) Curva de escoamento da fase superior das amostras, B) módulo complexo ( $G^*$ ) da fase superior das emulsões e C) curvas de escoamento da fase inferior das amostras (no detalhe as curvas de escoamento da fase inferior das emulsões com valores de pH 5,0 e 3,7). pH: ( $\diamond$ ) 7,0, ( $-$ ) 6,6, ( $\times$ ) 5,6, ( $\square$ ) 5,0, ( $\triangle$ ) 3,7 e ( $\circ$ ) 2,7.

A partir da Figura 4.19 pode-se notar que ambas as fases das emulsões com pH 7,0 e 6,6 apresentaram um comportamento reológico similar, concluindo-se que, juntamente com os dados de tamanho de gotas e estabilidade, esta pequena diferença de pH não foi suficiente para alterar as características da emulsão. A fase superior da emulsão com pH 5,6 apresentou viscosidade um pouco maior do que daquelas formadas em pH neutro. Esse fato provavelmente ocorreu devido ao decréscimo do pH, que promoveu diminuição da carga

líquida negativa, reduzindo a repulsão eletrostática e fazendo com que as gotas ficassem mais próximas, aumentando a viscosidade do sistema. Já em pH 5,0, o balanço entre as forças repulsivas e atrativas entre as gotas favoreceu as interações biopoliméricas, resultando na formação de uma rede protéica e, conseqüentemente, aumentando consideravelmente a viscosidade da fase superior. Entretanto, quando houve a redução do pH para 3,7, houve aumento das forças repulsivas provenientes do acréscimo das cargas positivas à superfície das gotas, resultando em uma diminuição da viscosidade das emulsões. Com uma adicional redução do pH para 2,7, os sistemas ficaram muito distantes do pI da proteína, de modo que a repulsão eletrostática se tornou suficiente para impedir a formação de uma rede estruturada. Assim, estes sistemas passaram a apresentar propriedades reológicas similares às obtidas para emulsões em pH neutro, porém com menor tendência à cremeação. Tais explicações estão de acordo com as curvas do módulo complexo ( $G^*$ ) da fase superior das emulsões, as quais indicam que as emulsões em pH 5,0 apresentaram-se mais estruturadas (maior valor de  $G^*$ ) do que as outras amostras, porém em pH 3,7 o sistema também mostrou-se mais estruturado que nos demais valores de pH de acordo com a microestrutura avaliada na Figura 4.18.

Em relação à fase inferior (Tabela 4.12), pode-se observar que as amostras com valores de pH 7,0, 6,6, 5,6 e 2,7 apresentaram dados de viscosidade estatisticamente iguais ( $p < 0,05$ ). Por outro lado, a fase inferior da emulsão com pH 3,7 apresentou comportamento de fluido pseudoplástico, com viscosidades aparentes à 10 e 100  $s^{-1}$  ( $\eta_{10}$  e  $\eta_{100}$ ) aproximadamente 30 e 10 vezes superior às das outras amostras, respectivamente. Entretanto, para pH próximo ao pI (pH 5,0), essa diferença entre as viscosidades da fase inferior foi ainda maior, sendo cerca de 60 vezes para  $\eta_{100}$  e da ordem de  $10^2$  para  $\eta_{10}$ , quando comparada com a emulsão formada em pH neutro (Tabela 4.12).

**Tabela 4.12.** Efeito do pH na viscosidade ( $\eta$ ) a 10 e 100 s<sup>-1</sup> das emulsões contendo 1 % (m/v) Na-CN e 30 % (v/v) óleo

pH final	Fase superior		Fase inferior	
	$\eta_{10}$ (Pa.s)	$\eta_{100}$ (Pa.s)	$\eta_{10}$ (Pa.s)	$\eta_{100}$ (Pa.s)
7,0	1,14 <sup>A</sup>	0,33 <sup>A</sup>	0,0019 <sup>A</sup>	0,0019 <sup>A</sup>
6,6	1,24 <sup>AB</sup>	0,33 <sup>A</sup>	0,0018 <sup>A</sup>	0,0018 <sup>A</sup>
5,6	1,83 <sup>B</sup>	0,43 <sup>A</sup>	0,0017 <sup>A</sup>	0,0017 <sup>A</sup>
5,0	5,46 <sup>C</sup>	0,57 <sup>B</sup>	0,66 <sup>B</sup>	0,11 <sup>B</sup>
3,7	3,92 <sup>D</sup>	0,58 <sup>B</sup>	0,07 <sup>C</sup>	0,02 <sup>C</sup>
2,7	0,54 <sup>A</sup>	0,17 <sup>C</sup>	0,0021 <sup>A</sup>	0,0021 <sup>A</sup>

Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os valores de viscosidade para cada fase da emulsão.

Relacionando os aspectos estruturais (Figura 4.18) e a estabilidade das emulsões (Figura 4.17), pode-se concluir que a estabilidade das amostras para valores de pH mais próximos ao ponto isoelétrico da proteína (pH 5,0 e 3,7) foi devido à formação de uma rede protéica causada pela neutralização das cargas negativas superficiais. Além disso, essa formação de gel foi responsável pela turbidez da fase inferior dessas amostras, já que a proximidade entre as gotas impediu a passagem de luz.

## **CAPÍTULO 4. Resultados e discussões**

### **PARTE 2. ESTUDO DE EMULSÕES A/A E EMULSÕES MÚLTIPLAS ESTABILIZADAS POR CASEINATO DE SÓDIO E LBG**



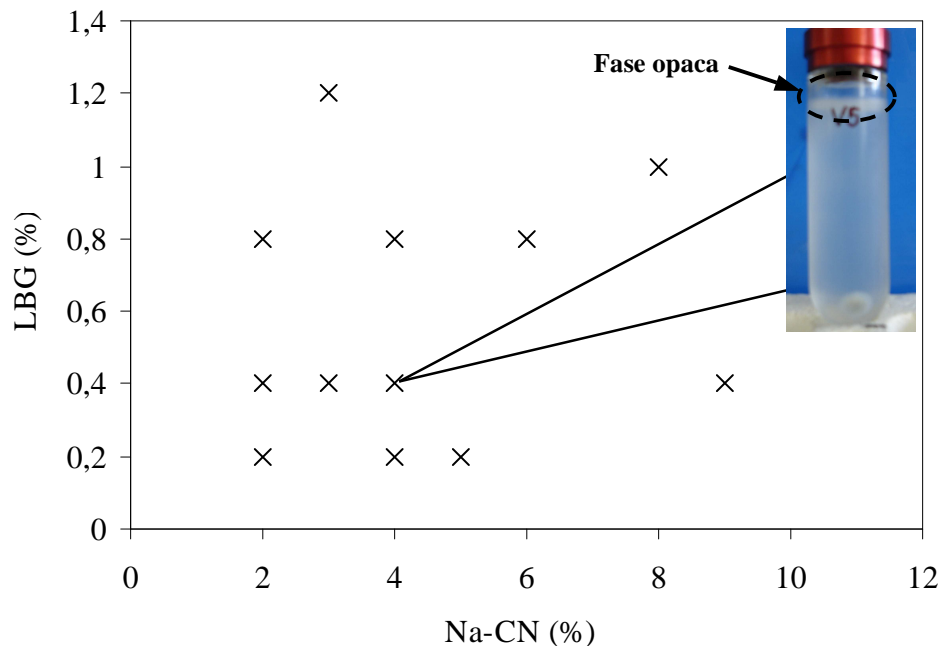


### **4.3.AVALIAÇÃO DA COMPATIBILIDADE DE SISTEMAS MISTOS NA-CN – LBG**

No caso dos sistemas aquosos, inicialmente foi realizado um estudo preliminar para a avaliação da separação de fases do sistema caseinato de sódio (Na-CN) – goma jataí (LBG) sob diferentes condições de pH e força iônica. Este estudo foi imprescindível para determinar as condições do meio em que as emulsões água-água (A/A) e emulsões múltiplas (O/A/A) seriam preparadas, já que para produção deste tipo de emulsão é necessário o uso de soluções de fases separadas (KIM et *al.*, 2006) e, além disso, as condições necessárias para a separação de fases variam de acordo com os biopolímeros presentes na solução (GRINBERG & TOLSTOGUZOV, 1997).

#### **4.3.1. Compatibilidade de sistemas em pH neutro**

Sistemas compostos por diversas concentrações de caseinato de sódio e jataí em pH 7,0 e 25°C foram avaliados a fim de se determinar a região onde ocorre a separação de fases entre estes dois ingredientes nestas condições. Após centrifugação a 60000g por 60 minutos observou-se que as amostras apresentaram a formação de uma pequena fase opaca em sua superfície. A Figura 4.20 apresenta as composições iniciais dos sistemas estudados, as quais foram obtidas através de análises químicas, juntamente com o aspecto visual típico apresentado por eles.



**Figura 4.20.** Sistemas formados por caseinato de sódio e jataí em pH 7,0. No destaque tem-se o aspecto visual típico destas misturas após centrifugação.

A fim de se entender as interações presentes nos sistemas, três amostras tiveram as suas fases cuidadosamente separadas e analisadas em relação à concentração de proteína ( $C_{\text{prot}}$ ) e polissacarídeo ( $C_{\text{poli}}$ ) (Tabela 4.13). Entre parênteses estão apresentadas as porcentagens dos biopolímeros em relação à concentração na solução inicial.

**Tabela 4.13.** Composição das fases de sistemas em pH 7,0

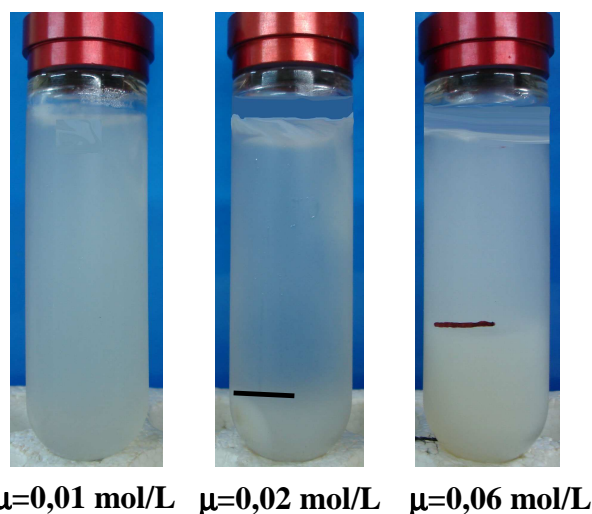
Sistema	Solução inicial (%, m/v)			Fase superior (%, m/v)			Fase inferior (%, m/v)		
	$C_{\text{prot}}$	$C_{\text{poli}}$	Razão $C_{\text{prot}}/C_{\text{poli}}$	$C_{\text{prot}}$	$C_{\text{poli}}$	Razão $C_{\text{prot}}/C_{\text{poli}}$	$C_{\text{prot}}$	$C_{\text{poli}}$	Razão $C_{\text{prot}}/C_{\text{poli}}$
1	1,37	0,27	5,07	1,17	0,20	5,85	1,43	0,22	6,5
				(85,4%)	(74,1%)		(104,4%)	(81,5%)	
2	2,83	0,19	14,9	2,83	0,16	17,7	2,94	0,17	17,3
				(100%)	(84,2%)		(103,9%)	(89,5%)	
3	3,08	0,25	12,32	2,72	0,24	11,3	2,96	0,26	11,4
				(88,3%)	(96,0%)		(96,10%)	(104%)	

A partir da Tabela 4.13 pode-se observar que a fase superior das amostras apresentou menor concentração dos dois biopolímeros em relação à composição da solução inicial, enquanto que a fase inferior não apresentou uma tendência clara. No entanto, a relação entre as

concentrações de proteína e polissacarídeo (razão  $C_{\text{prot}}/C_{\text{poli}}$ ) se manteve aproximadamente constante em ambas as fases em relação à solução inicial. Neste caso, possivelmente ocorreu uma pequena precipitação dos biopolímeros devido à alta força aplicada durante a centrifugação das amostras. Desta maneira, pode-se concluir que o caseinato de sódio e a goma jataí não apresentam separação de fases em pH 7,0, existindo uma baixa tendência para separação de fases, mesmo em altas concentrações de biopolímeros. O mesmo foi observado para a mistura de caseína com goma guar (ANTONOV *et al.*, 1999), a qual é um polissacarídeo de estrutura similar (galactomanana) e neutro. No estudo destes autores, o processo de separação de fases entre os biopolímeros foi observada apenas em valores de força iônica superiores a 0,09 M.

#### 4.3.2. Influência da força iônica na compatibilidade dos sistemas

Para a avaliação da influência da adição de sais na compatibilidade de sistemas caseinato de sódio-jataí, foram utilizadas concentrações fixas de proteína (6 % m/v) e de polissacarídeo (0,8 % m/v). Cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) foi adicionado em diversas concentrações de maneira a gerar diferentes forças iônicas (0,01 mol/L, 0,02 mol/L, 0,06 mol/L e 0,12 mol/L) (item 3.2.3). Entretanto, a amostra com força iônica de 0,12 mol/L apresentou gelificação imediatamente após a adição de sal, não sendo possível a avaliação deste sistema. A Figura 4.21 ilustra o aspecto visual dos sistemas adicionados de  $\text{CaCl}_2$  após centrifugação a 60000g por 60 minutos.



**Figura 4.21.** Sistemas formados por caseinato de sódio e jataí estudados em diferentes condições de força iônica. A linha indica o limiar entre as duas fases separadas.

Observando-se a Figura 4.21 pode-se observar que o sistema com força iônica de 0,01 mol/L não apresentou separação de fases visual. A formação de duas fases foi verificada apenas para valores de força iônica igual ou superior a 0,02 mol/L. A fim de entender as interações existentes nos sistemas bipolímeros com adição de  $\text{CaCl}_2$ , a solução inicial e as fases separadas novamente tiveram a sua composição determinada através de análises químicas (Tabela 4.14). Entre parênteses estão as porcentagens de biopolímeros em relação à solução inicial.

**Tabela 4.14.** Composição das fases de sistemas com adição de  $\text{CaCl}_2$

Força iônica	Solução inicial (%, m/v)			Fase superior (%, m/v)			Fase inferior (%, m/v)		
	$C_{\text{prot}}$	$C_{\text{poli}}$	Razão $C_{\text{prot}}/C_{\text{poli}}$	$C_{\text{prot}}$	$C_{\text{poli}}$	Razão $C_{\text{prot}}/C_{\text{poli}}$	$C_{\text{prot}}$	$C_{\text{poli}}$	Razão $C_{\text{prot}}/C_{\text{poli}}$
0,02 mol/L	4,70	0,351	13,4	4,40 (93,6%)	0,347 (98,9%)	12,7	6,33 (134,7%)	0,262 (74,6%)	24,2
0,06 mol/L	5,23	0,355	14,7	1,61 (30,8%)	0,448 (126,2%)	3,59	10,33 (197,5%)	0,049 (13,8%)	210

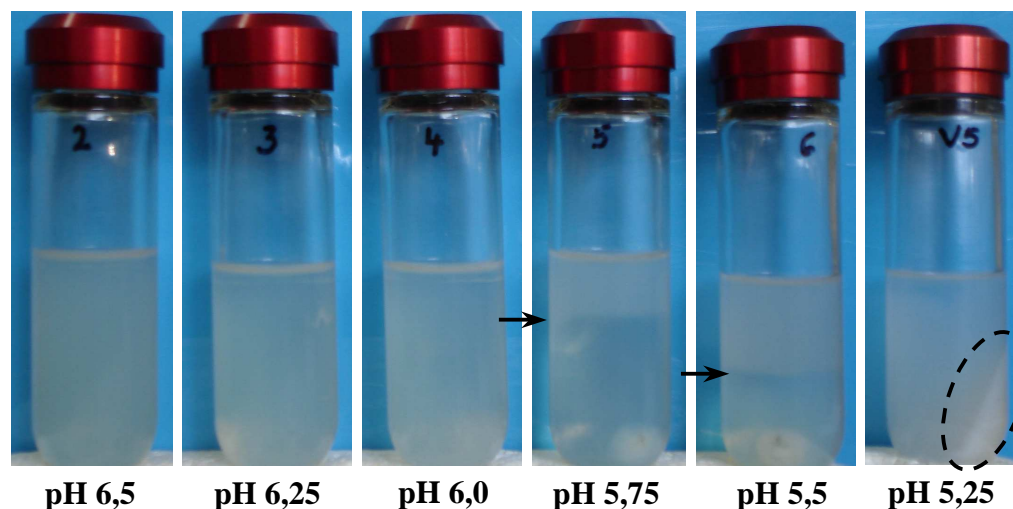
A partir dos resultados apresentados na Tabela 4.14 é possível observar que ambos os sistemas apresentam a fase superior rica em polissacarídeo e a fase inferior rica em proteína, caracterizando uma separação de fases entre os dois biopolímeros. Além disso, pode-se verificar que o processo de separação de fases do sistema se intensifica com o aumento da força iônica. Esta influência da adição de sal na compatibilidade dos sistemas pode ser explicada pelos efeitos de “salting in” e “salting out”. Estudos anteriores (GRINBERG & TOLSTOGUZOV, 1997; ANTONOV *et al.*, 1999 e NEIRYNCK *et al.*, 2007) mostraram que misturas proteínas – polissacarídeos neutros, sob condição de baixa força iônica, resultaram na formação de fracos complexos interpoliméricos, os quais foram destruídos com o aumento da força iônica, resultando na incompatibilidade dos biopolímeros. Assim como observado por Antonov *et al.* (1999) para sistemas mistos caseína – goma guar, o sistema Na-CN – LBG estudado apresentou um efeito de “salting in” para valores de força iônica abaixo de 0,01 mol/L. No entanto, diferentemente dos sistemas caseína – guar que apresentaram efeito “salting out” para força iônica acima de 0,09 mol/L (ANTONOV *et al.*, 1999), os sistemas estudados neste trabalho apresentaram esse efeito para valores de força iônica acima de 0,02 mol/L.

### 4.3.3. Compatibilidade dos sistemas com a variação do pH

Para a avaliação da influência do pH na compatibilidade dos sistemas novamente utilizou-se a solução formada por 6 % (m/v) de caseinato de sódio e 0,8 % (m/v) de LBG.

#### ✓ *Acidificação direta com HCl*

As soluções mistas foram acidificadas diretamente com o uso de HCl até atingirem os valores de pH 6,5, 6,25, 6,0, 5,75, 5,50 e 5,25, todos acima do ponto isoelétrico da caseína. A Figura 4.22 apresenta os sistemas com diferentes valores de pH após centrifugação a 60000g por 60 minutos.



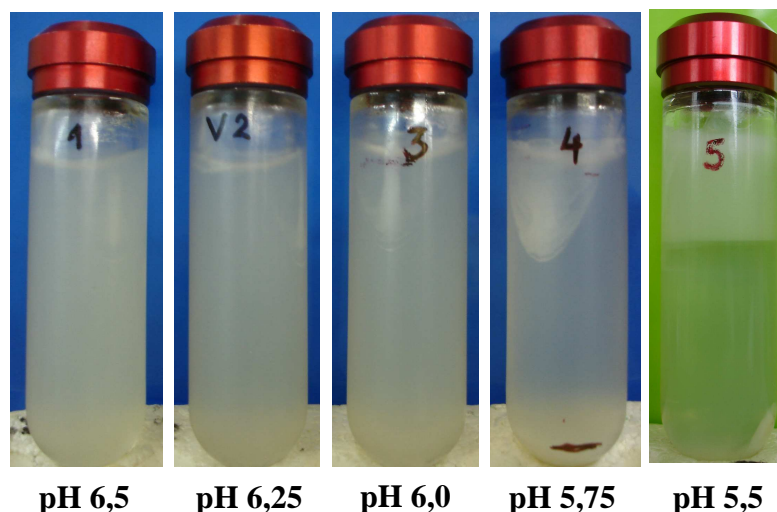
**Figura 4.22.** Sistemas formados por caseinato de sódio e jataí acidificados com HCl a diferentes valores de pH.

Observando-se as amostras após centrifugação (Figura 4.22), pode-se verificar que as mesmas apresentam separação de fases visual apenas em valores de pH abaixo de 6,0, sendo que para o pH 5,25 o sistema apresentou a fase inferior (rica em proteína) gelificada. Isso ocorre, pois o abaixamento do pH promove uma diminuição da repulsão eletrostática entre as moléculas de proteína, resultando em um aumento da auto-associação das moléculas e, conseqüentemente, em aumento da separação de fases.

#### ✓ *Acidificação das soluções de proteína e polissacarídeo separadamente*

Neste caso, as soluções de proteína e polissacarídeo foram acidificadas separadamente com o uso de HCl e, posteriormente, misturadas para a avaliação da compatibilidade. As

amostras seriam acidificadas até os pHs 6,5, 6,25, 6,0, 5,75, 5,5 e 5,25, porém, quando o pH atingiu valores próximos à 5,25, ocorreu gelificação da solução de proteína, inviabilizando a sua mistura com a solução de polissacarídeo. Assim, a avaliação da compatibilidade dos sistemas não foi realizada para a condição de pH igual a 5,25. O aspecto visual destes sistemas pode ser observado na Figura 4.23.



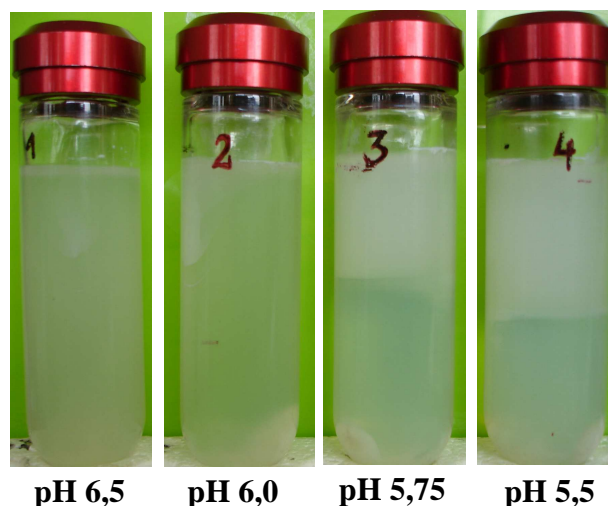
**Figura 4.23.** Sistemas formados por soluções de caseinato de sódio e jataí acidificadas separadamente com HCl até alcançar diferentes valores de pH.

Na Figura 4.23 pode-se observar que, da mesma maneira que para a acidificação direta com HCl (item anterior), as amostras apresentaram separação de fases visual apenas para valores de pH abaixo de 6,0. Entretanto, a acidificação das soluções separadamente resultou em maior compatibilidade dos sistemas quando comparados com aqueles formados através da acidificação das soluções mistas. Este fato provavelmente ocorreu pois, no caso da acidificação das soluções em separado, a perturbação do sistema ocorreu apenas no momento da mistura das duas soluções, enquanto que no caso da acidificação da solução mista, tanto a mistura das soluções quanto a mudança do solvente promoveram uma perturbação do sistema, levando a um maior rearranjo das moléculas e,conseqüentemente, a uma maior separação de fases.

✓ *Acidificação lenta com adição de GDL*

Os sistemas mistos Na-CN – LBG foram acidificados através da adição de GDL de forma a apresentarem pHs finais em torno de 6,5, 6,0, 5,75 e 5,5. Neste caso, o sistema com

pH 5,25 não foi avaliado pois, a partir dos estudos realizados com acidificação direta (itens anteriores), verificou-se que esta condição de acidificação resultou em gelificação. Para a determinação da razão GDL/caseinato a ser adicionada aos sistemas para a obtenção dos pHs desejados, foi feito um teste no qual diversas razões foram adicionadas a 25 °C e o pH medido até atingir o equilíbrio (após cerca de 24h). Assim, determinou-se que para a obtenção dos pHs finais de 6,5, 6,0, 5,75 e 5,5, o GDL deveria ser adicionado nas razões GDL/caseinato 0,03, 0,042, 0,06 e 0,083, respectivamente. As amostras foram centrifugadas após 24h da adição do GDL e a compatibilidade avaliada por inspeção visual (Figura 4.24).



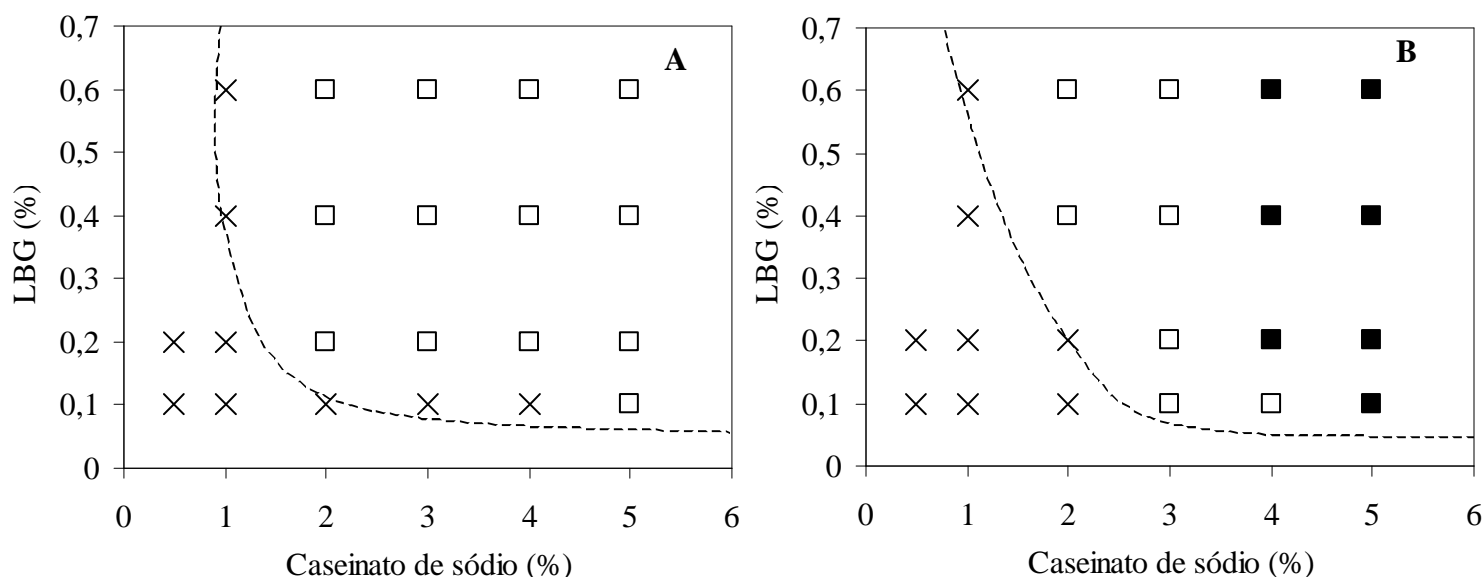
**Figura 4.24.** Sistemas formados por soluções de caseinato de sódio e jataí acidificadas lentamente através da adição de GDL até o alcance de diferentes valores de pH.

As amostras apresentaram separação de fases apenas em pH abaixo de 6,0. Entretanto, comparando-se com os outros tipos de acidificação pode-se notar que a acidificação lenta promoveu maior e mais nítida separação de fases. Isso pode ter ocorrido pois, no caso da acidificação lenta, as moléculas tiveram maior tempo para se rearranjar na solução aquosa antes do abaixamento do pH, facilitando o processo de separação de fases.

#### 4.4.CONSTRUÇÃO DE DIAGRAMA DE FASES

A partir dos estudos realizados para a avaliação da compatibilidade de sistemas mistos Na-CN –LBG (item 4.3), observou-se que a separação de fases entre estes dois biopolímeros ocorreu apenas para valores de força iônica superiores a 0,01 mol/L ou valores de pH inferiores a 6,0. Devido à enorme gama de produtos lácteos acidificados no mercado, optou-se

pelo estudo dos sistemas acidificados através da adição de GDL. Assim, foram estabelecidos diagramas visuais para a mistura Na-CN – LBG em duas diferentes condições de acidificação: (i) razão GDL/proteína = 0,083 e (ii) razão GDL/proteína = 3,8 (Figura 4.25). Estas razões foram escolhidas por resultarem em valores finais de pH acima e abaixo do ponto isoelétrico da proteína (pHs 5,5 e 2,5), respectivamente. Produtos alimentícios como sucos, geléias e refrescos apresentam pH na faixa de 2 a 3, enquanto que laticínios em geral possuem valores de pH em torno de 5 e 6 (OLIVEIRA *et al.*, 2000). Assim, na primeira condição de acidificação, as proteínas encontravam-se negativamente carregadas, enquanto que na segunda condição as mesmas apresentavam excesso de cargas positivas. Para a construção destes diagramas, foram preparadas soluções mistas contendo diferentes concentrações de proteína e polissacarídeo. Estas soluções foram acidificadas pela adição de GDL a 25°C e, após 24 horas, centrifugadas a 60.000g por 60 minutos. A partir de observações visuais pode-se observar quais sistemas mostraram separação de fases e quais apresentaram gelificação da fase inferior.



**Figura 4.25.** Diagramas visuais de fases para o sistema caseinato de sódio-jataí acidificado com diferentes razões GDL/proteína: A) 0,083 ( $pH_{final} = 5,5$ ) e B) 3,8 ( $pH_{final} = 2,5$ ). (x) região de 1 fase, (□) região de 2 fases e (■) região de 2 fases com gelificação da fase inferior. A linha pontilhada representa uma tendência de separação de fases.

Os diagramas de fases construídos com essas diferentes condições puderam ser divididos em duas regiões distintas: região monofásica (1 fase) e bifásica (2 fases). Em



concentrações de Na-CN e LBG relativamente baixas, houve formação de uma única fase homogênea, mesmo após a centrifugação. Com o aumento das concentrações dos biopolímeros, as soluções apresentaram separação de fases, com a formação de uma fase superior mais opaca e uma fase inferior mais translúcida. A análise química destas fases indicou que a fase superior era rica em polissacarídeo e a fase inferior rica em proteína, como pode ser observado para o sistema composto por 4 % (m/v) Na-CN e 0,4 % (m/v) LBG (Figura 4.26A).

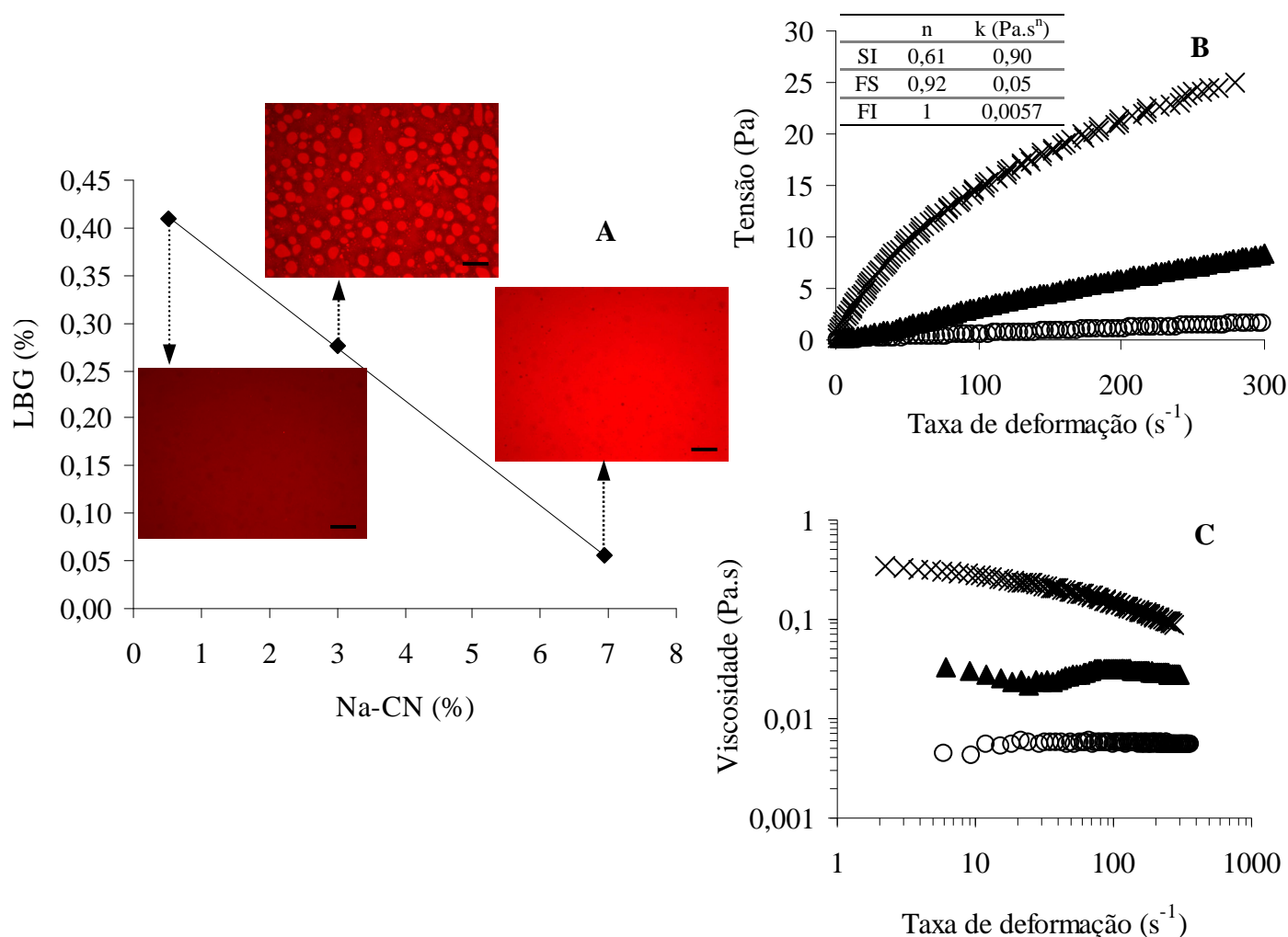
Observa-se na Figura 4.25 que o diagrama construído em pH 2,5 (Figura 4.25B) apresentou menor região bifásica quando comparado com aquele construído em pH 5,5 (Figura 4.25A). Além disso, para a condição de pH abaixo do pI (Figura 4.25B), pode-se observar a formação de alguns pontos no diagrama com a fase inferior gelificada. Esse processo de gelificação ocorre em uma das fases separadas quando a concentração de um dos biopolímeros excede uma determinada concentração crítica para gelificação. A concentração crítica para gelificação usualmente não excede 0,1 % a 0,5 % para polissacarídeos aniônicos, enquanto que para as proteínas esse valor é variável, sendo de 3 % a 10 % para as proteínas globulares (TOLSTOGUZOV, 2006).

Como alguns dos sistemas que apresentaram separação de fases em pH 2,5 tiveram sua fase inferior gelificada após a centrifugação, esta condição de acidificação não foi utilizada para o preparo de emulsões água-água (A/A), já que este processo consiste na mistura de frações da fase superior com a fase inferior formadas após centrifugação. Desta maneira, para o preparo das emulsões A/A foi escolhida uma mistura composta por 4 % m/v Na-CN e 0,4 % m/v LBG em pH 5,5, a qual se encontra na bifásica do diagrama de fases nestas condições, além de apresentar fases com volumes similares (volume da fase superior = 5 mL e volume da fase inferior = 3 mL).

#### **4.5. EMULSÕES ÁGUA – ÁGUA (A/A)**

A solução escolhida para o preparo das emulsões A/A (4 % m/v Na-CN e 0,4 % m/v LBG em pH 5,5) foi inicialmente centrifugada a 60.000g por 60 minutos a 25°C de maneira a promover a separação de fases. As fases formadas foram então cuidadosamente retiradas com o uso de pipetas e armazenadas para análises. Finalmente, solução inicial, fase superior e fase

inferior tiveram a sua composição determinada através de análises químicas, além de serem analisadas em termos reológicos e microestruturais (Figura 4.26).



**Figura 4.26.** Caracterização química, reológica e microestrutural dos sistemas. A) Linha de amarração da mistura 4 % (m/v) Na-CN – 0,4 % (m/v) LBG em pH 5,5 e microestrutura por fluorescência, B) curvas de escoamento e ajustes das curvas aos modelos reológicos e C) variação da viscosidade com a taxa de deformação. (▲) Solução inicial, (×) fase superior e (○) fase inferior. Barra da escala = 100  $\mu m$ .

A Figura 4.26A apresenta a linha de amarração referente à mistura 4 % (m/v) Na-CN – 0,4 % (m/v) LBG juntamente com a microestrutura da solução inicial e de cada uma das fases. As concentrações de proteína e polissacarídeo foram, respectivamente, 3 % e 0,28 % para a solução inicial, 0,5 % e 0,41 % para a fase superior (rica em polissacarídeo) e 7 % e 0,05 % para a fase inferior (rica em proteína) dos sistemas. Neste caso, como a composição dos

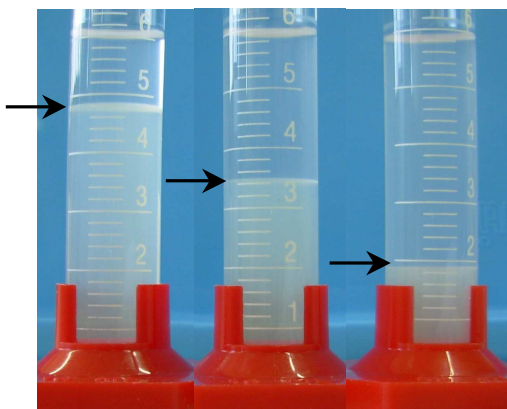
sistemas foi determinada através de análises químicas, pode-se observar que o conteúdo de biopolímeros da solução inicial não correspondeu às concentrações nominais, provavelmente devido à presença de impurezas nas soluções e imprecisão dos métodos utilizados. Assim, para verificar a exatidão dos métodos analíticos, utilizou-se o método de razão de volumes. A razão de volumes experimental ( $VR_{exp}$ ) foi obtida a partir do volume das fases separadas (Equação 3), enquanto que a razão de volumes teórica ( $VR_{teórica}$ ) foi obtida a partir da composição das fases (Equação 4). Como resultados, foram obtidos valores de 62,5 % e 61,7 % para  $VR_{exp}$  e  $VR_{teórica}$ , respectivamente, sendo a diferença entre esses dois parâmetros em torno de 1,3 %. Dessa forma, pode-se concluir que as concentrações de biopolímeros obtidas a partir das análises químicas estão de acordo com o balanço de massa do sistema.

A composição destes sistemas pode ser relacionada com a microestrutura obtida por microscopia de fluorescência (Figura 4.26A), sendo as regiões mais claras das imagens correspondentes à presença de proteína, enquanto que as regiões mais escuras indicaram a ausência de proteína, já que o corante Rodamina B foi utilizado para marcar este último componente. Desta forma, a solução inicial apresentou uma estrutura composta por gotas de agregados protéicos dispersas em uma fase contínua rica em polissacarídeo, enquanto que as fases superior e inferior apresentaram microestrutura bastante homogênea, contendo poucas e pequenas gotículas inclusas formadas por proteína e polissacarídeo, respectivamente. As gotas presentes na solução inicial apresentaram diâmetros inferiores a 50  $\mu m$ , sendo estes um pouco maiores do que aqueles observados por Norton e Frith (2001) (faixa de 2 a 20  $\mu m$ ) para diversas misturas de biopolímeros. Além disso, essas gotas apresentaram formato não totalmente esférico, o que sugere a existência de baixa energia interfacial líquido-líquido atuando nesse sistema (NORTON & FRITH, 2001). Comparando os resultados de microscopia e composição química das fases separadas, pode-se concluir que este sistema Na-CN – LBG em pH 5,5 apresentou quase completa separação de fases após o processo de centrifugação, já que o equilíbrio entre as fases é alcançado quando ambas as fases estão livres de qualquer inclusão (SIMEONE et al., 2004).

Medidas reológicas em estado estacionário (Figura 4.26B) foram realizadas para o sistema Na-CN – LBG. A solução inicial e a fase superior apresentaram comportamento pseudoplástico, enquanto que a fase inferior comportou-se como um fluido Newtoniano, apesar de haver ocorrido alguma agregação protéica com a diminuição do pH. Além disso,

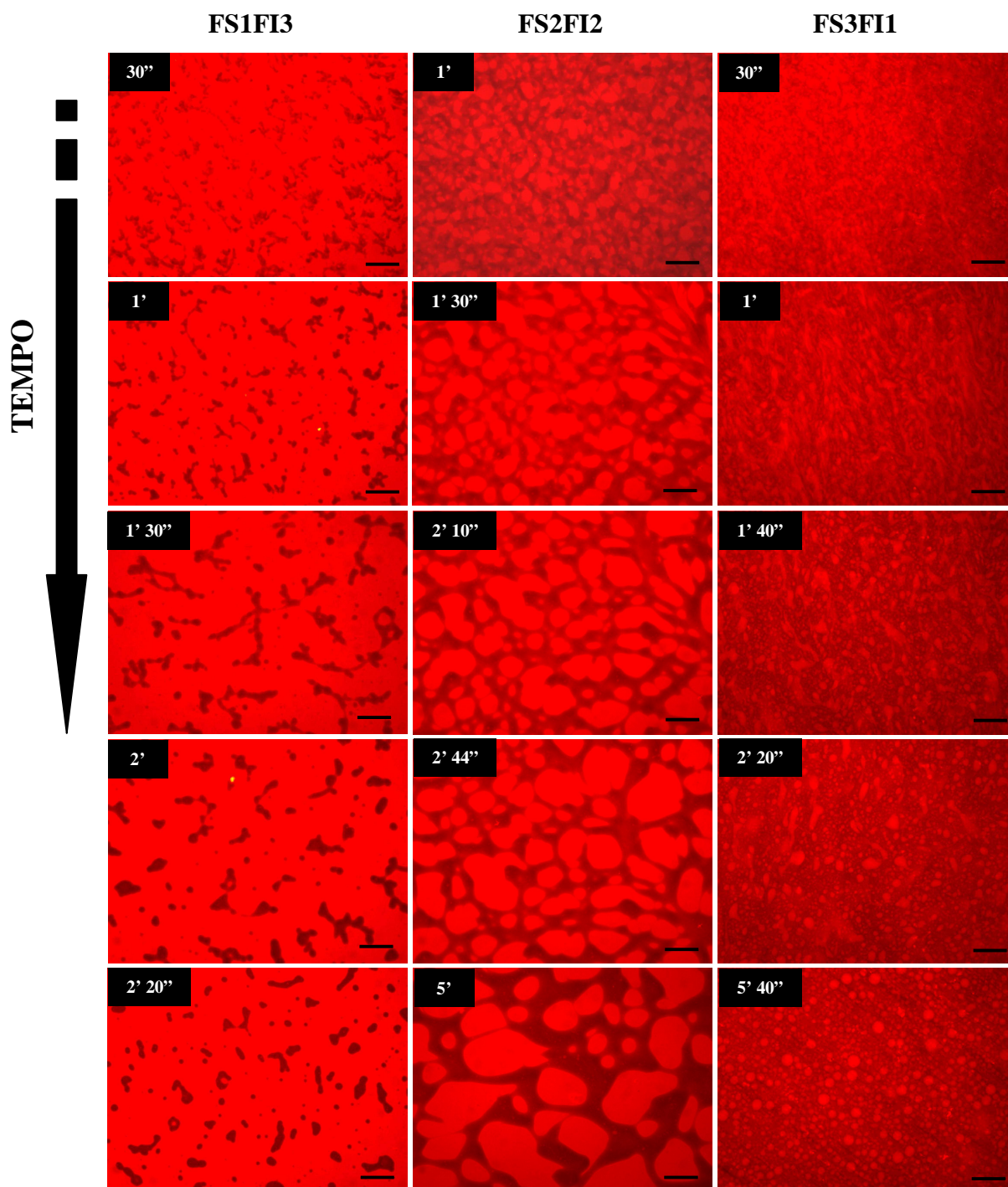
verificou-se que a fase superior apresentou viscosidade maior do que a solução inicial, enquanto que a fase inferior apresentou-se menos viscosa do que as outras soluções (Figura 4.26C). Esse fato novamente pode ser explicado pela composição das fases, já que o comportamento da fase superior foi relacionado à presença de LBG, que é um polissacarídeo altamente viscoso e que apresenta um comportamento pseudoplástico, como a maioria dos polímeros de alta massa molar (MANDALA et al., 2004), enquanto que o comportamento da fase inferior foi relacionado à sua elevada concentração de caseinato de sódio e quase ausência de LBG. Já o comportamento pseudoplástico da solução inicial pode ser explicado pela predominância do polissacarídeo na fase contínua, apesar deste ingrediente estar presente na solução em uma concentração muito menor quando comparado com a proteína. Entretanto, apesar da solução inicial se comportar como um fluido pseudoplástico, pode-se observar um pequeno aumento na viscosidade a partir de uma taxa de deformação de aproximadamente  $40 \text{ s}^{-1}$ . Neste caso, o aumento na taxa de deformação provavelmente promoveu uma ruptura das gotas de agregados protéicos, resultando na formação de gotas menores e, conseqüentemente, em um predomínio da viscosidade da fase contínua (rica em polissacarídeo).

Após a caracterização da solução inicial e das fases separadas, uma série de emulsões água-água (A/A) foi preparada pela mistura de diferentes razões mássicas de fase superior e inferior (1:3, 2:2 e 3:1), as quais foram denominadas FS1FI3, FS2FI2 e FS3FI1. Imediatamente após o preparo, as amostras foram colocadas em provetas graduadas e estocadas a  $25^\circ\text{C}$ , e as mudanças observadas por inspeções visuais. A separação de fases macroscópica das emulsões FS1FI3, FS2FI2 e FS3FI1 começou a ser observada após aproximadamente 20, 27 e 90 minutos, respectivamente, podendo-se concluir que as emulsões se tornaram mais estáveis com o aumento da concentração de polissacarídeo. A Figura 4.27 apresenta o aspecto visual das emulsões após o processo de separação de fases.



**Figura 4.27.** Aspecto visual das emulsões A/A após desestabilização: (A) FS1FI3, (B) FS2FI2 e (C) FS3FI1.

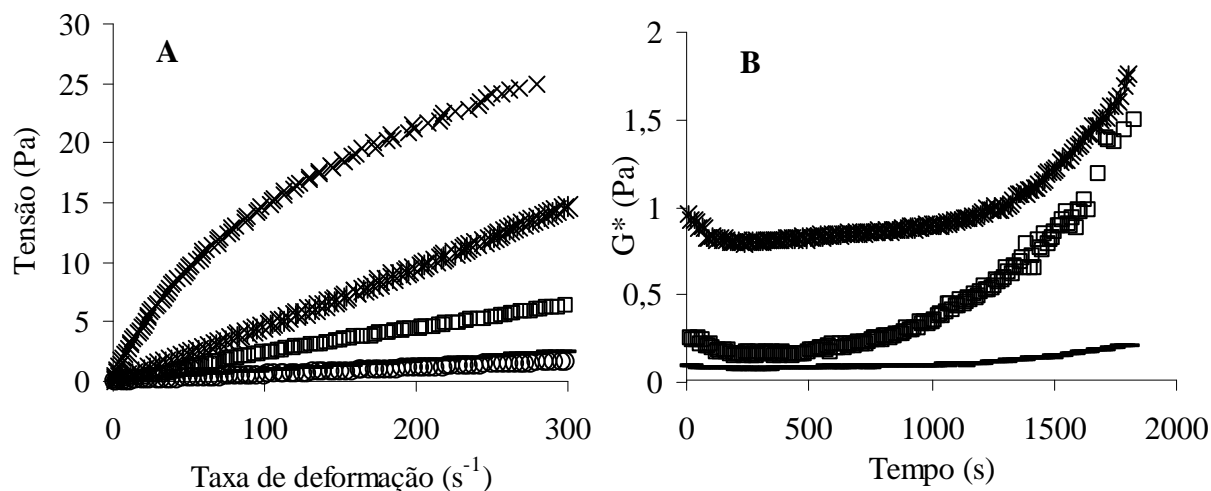
As mudanças das emulsões A/A ao longo do tempo também foram monitoradas utilizando-se microscopia de fluorescência. Imediatamente após o preparo, as emulsões foram colocadas em lâminas, cobertas com lamínulas e observadas em microscópio de fluorescência ao longo de aproximadamente 10 minutos (Figura 4.28). A partir das imagens de microscopia apresentadas na Figura 4.28, pode-se observar que a emulsão FS1FI3 é composta por gotas alongadas de polissacarídeos dispersas em uma fase contínua protéica. Ao longo do tempo, as gotas passam a apresentar maior tamanho devido à coalescência, além de um formato mais arredondado que pode ser atribuído aos efeitos de tensão superficial (a tendência de reduzir a área de contato entre líquidos imiscíveis) (KIM et *al.*, 2006). A emulsão FS3FI1 apresenta comportamento bastante similar ao sistema FS1FI3, porém com a presença de gotas de proteína dispersas em um meio contínuo rico em polissacarídeo. Já a emulsão FS2FI2, que inicialmente apresenta estrutura bicontínua, passa a apresentar características semelhantes à amostra FS3FI1, porém com a formação de gotas maiores e menos esféricas.



**Figura 4.28.** Variação da microestrutura das emulsões A/A com o tempo. Barra = 100  $\mu\text{m}$

As propriedades reológicas dinâmicas (Figura 4.29B) e em estado estacionário (Figura 4.29A) das emulsões A/A foram determinadas de maneira a obter informações a respeito de sua estabilidade e da influência da razão mássica das fases na viscosidade dos sistemas. O

comportamento reológico das fases superior e inferior puras (FS e FI) também foram apresentadas na Figura 4.29A.



**Figura 4.29.** Comportamento reológico de emulsões A/A. A) Curvas de escoamento e B) variação do módulo complexo ( $G^*$ ) com o tempo: (×) FS, (○) FI, (—) FS1FI3, (□) FS2FI2 e (×) FS3FI1.

**Tabela 4.15.** Ajustes reológicos das curvas de escoamento

	n	k (Pa.s <sup>n</sup> )	R <sup>2</sup>	$\eta_{10s}^{-1}$ (Pa.s)
FS	0,61	0,898	99,48	0,367
FS1FI3	0,93	0,012	99,86	0,011
FS2FI2	0,92	0,034	99,79	0,028
FS3FI1	1,00	0,048	99,76	0,048
FI	1,00	0,006	99,92	0,006

A Figura 4.29A apresenta as curvas de escoamento das emulsões A/A, bem como das fases separadas do sistema utilizado no preparo destas emulsões (4 % m/v Na-CN e 0,4 % m/v LBG), enquanto que a Tabela 4.15 apresenta os parâmetros resultantes dos ajustes dessas curvas aos modelos reológicos (Equações 8 e 9). A partir destes dados observou-se que a emulsão FS3FI1 apresentou comportamento Newtoniano, da mesma maneira que a fase inferior do sistema inicial, enquanto que emulsões FS1FI3, FS2FI2 e a fase superior foram melhor ajustadas utilizando-se o modelo Lei da Potência. A fase superior (FS) do sistema inicial foi a solução que apresentou maior viscosidade em todas as taxas de deformação e maior pseudoplasticidade ( $n = 0,61$ ) em relação às outras amostras, provavelmente devido à elevada concentração de LBG em sua composição. Já a fase inferior, que é rica em proteína e

pobre em polissacarídeo, foi a solução de menor viscosidade entre todas as amostras ( $\eta_{10s}^{-1}$  mais de 10 vezes menor). As emulsões A/A mostraram valores intermediários de viscosidade, diferentemente do que foi observado por Kim et al. (2006) para emulsões A/A compostas por proteína do soro desnaturada e pectina, em que uma das emulsões A/A apresentou maior viscosidade do que as fases separadas. Comparando os resultados de microscopia de fluorescência (Figura 4.28) e propriedades reológicas em estado estacionário (Figura 4.29A), pode-se concluir que o comportamento reológico das emulsões foi determinado pela fase dispersa das mesmas, já que o sistema FS1FI3, que possui uma fase dispersa rica em proteína, foi o que apresentou menor viscosidade. O mesmo predomínio da fase dispersa foi observado para a emulsão FS3FI1. Entretanto, a emulsão FS2FI2 não seguiu esse mesmo comportamento, provavelmente devido ao elevado tamanho de gotas fazendo com que essa emulsão seja considerada bicontínua.

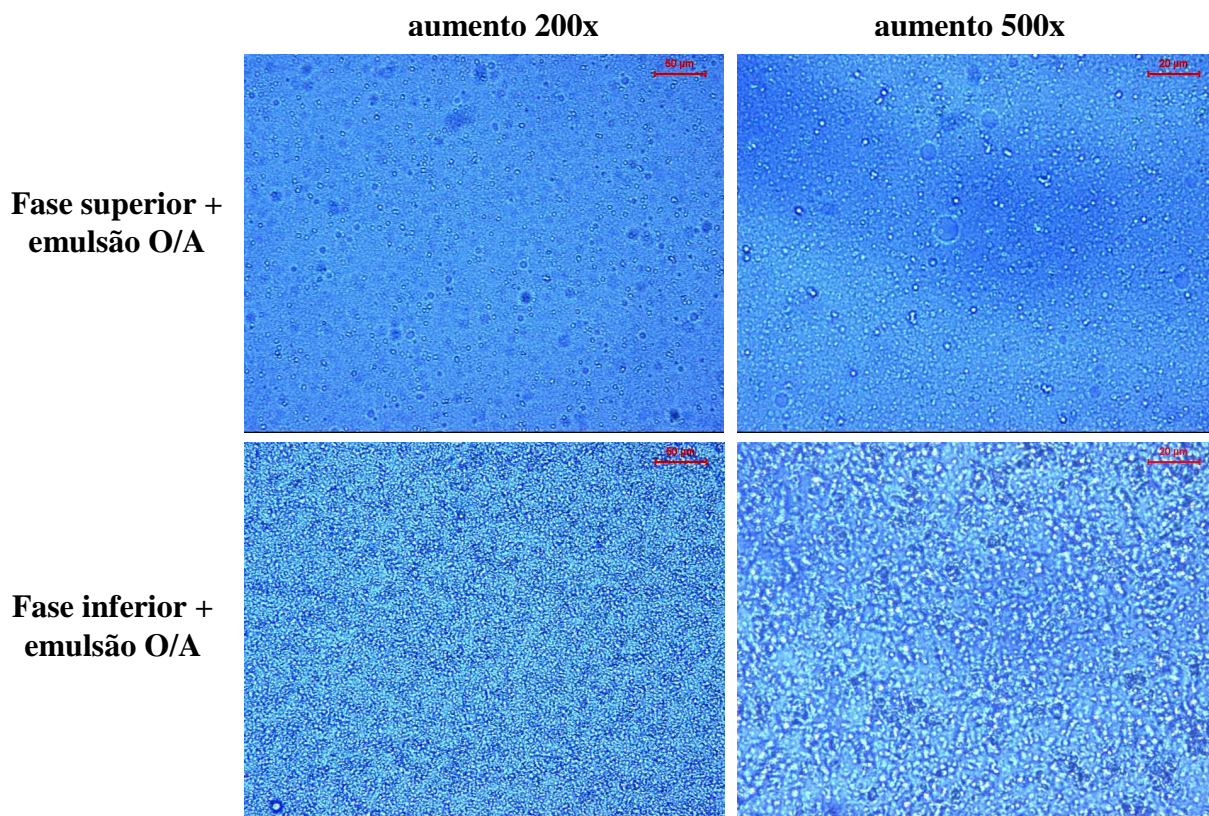
A mudança da estrutura das emulsões A/A com o tempo de estocagem pode ser observada a partir das medidas reológicas dinâmicas (Figura 4.29B). Esses resultados indicaram que a emulsão FS3FI1 foi mais estruturada do que os outros tipos de sistema, o que pode ser relacionado com os dados de estabilidade, já que esta emulsão foi a mais estável. Além disso, verifica-se que este comportamento está relacionado com a viscosidade da fase contínua, de modo que a amostra com fase contínua mais viscosa (FS3FI1) foi a que apresentou maior estabilidade.

#### 4.6. EMULSÕES MÚLTIPLAS

Diferentes emulsões múltiplas foram preparadas pela mistura de 0,5 g de uma emulsão O/A com 10 g de uma solução de fases separadas (KIM et al., 2006). A emulsão O/A utilizada para o preparo de todas as amostras foi composta por 1 % (m/v) Na-CN, 30 % (v/v) de óleo e homogeneizada a 600 bar utilizando-se a válvula 1 (item 4.1.3), enquanto que as soluções aquosas foram as que formaram as emulsões A/A (fase superior pura, FS1FI3, FS2FI2, FS3FI1 e fase inferior pura) (item 4.5). Como estas soluções de fases separadas foram formadas em pH 5,5, a emulsão O/A foi acidificada através da adição de GDL na razão GDL/proteína de 0,083 para que as emulsões múltiplas apresentassem esse mesmo pH final.



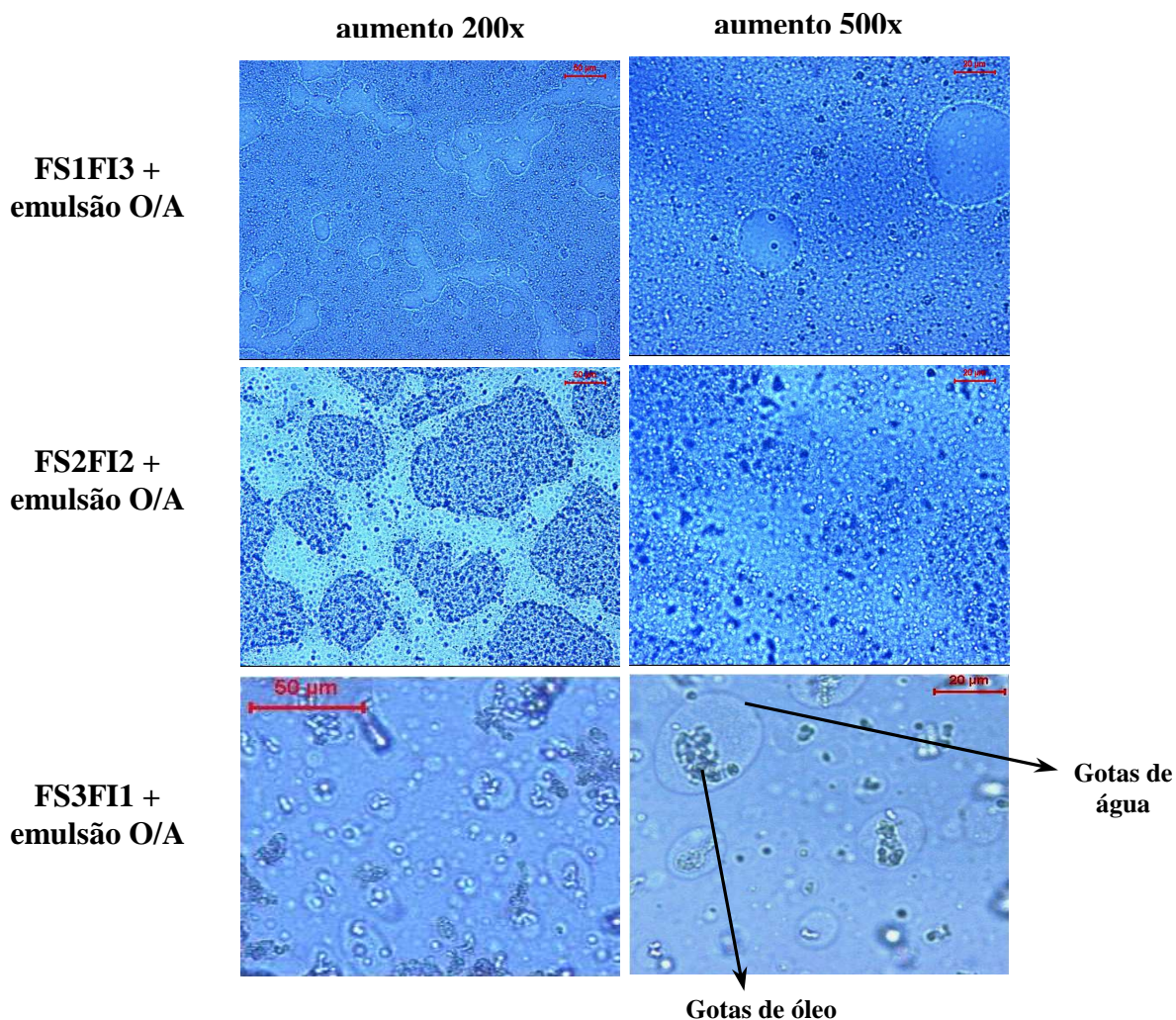
A mistura da emulsão O/A com as fases puras separadas da solução 4 % (m/v) Na-CN e 0,4 % (m/v) LBG não resultou na formação de uma emulsão múltipla, como pode ser observado na Figura 4.30.



**Figura 4.30.** Microestrutura das soluções formadas pela mistura de uma das fases separadas da solução 4 % (m/v) Na-CN e 0,4 % (m/v) LBG com uma emulsão O/A estabilizada por caseinato de sódio e homogeneizada a 600 bar. Barras da escala: 50 µm (para aumento de 200x) e 20 µm (para aumento de 500x).

A partir destas imagens pode-se notar a presença de pequenas gotas de óleo dispersas em uma fase contínua aquosa que, no caso da fase superior, é rica em polissacarídeos e a inferior, rica em proteínas. Além disso, pode-se observar a presença de floculação na amostra formada pela mistura da emulsão O/A com a fase inferior (rica em caseinato de sódio), provavelmente devido à alta concentração de proteína no meio aquoso, resultando no mecanismo de floculação por depleção (MCCLEMENTS, 2005). O mesmo fenômeno foi observado por Kim et al. (2006) para emulsões contendo proteínas do soro desnaturadas e pectina, porém o processo de floculação por depleção foi observado para o sistema formado pela fase rica em polissacarídeo, ao invés da fase rica em proteínas.

A Figura 4.31 apresenta a microestrutura das emulsões múltiplas formadas pela mistura da emulsão O/A com as soluções de fases separadas FS1FI3, FS2FI2 e FS3FI1, as quais foram observadas em microscópio ótico sob diferentes aumentos.



**Figura 4.31.** Microestrutura das emulsões múltiplas formadas pela mistura de uma solução mista de fases separadas (FS1FI3, FS2FI2 e FS3FI1) com uma emulsão O/A estabilizada por caseinato de sódio e homogeneizada a 600 bar. Barras da escala: 50 µm (para aumento de 200x) e 20 µm (para aumento de 500x).

Observando-se as imagens apresentadas na Figura 4.31, verificou-se que, diferentemente dos sistemas compostos pela mistura da emulsão O/A com as fases separadas (Figura 4.30), estas apresentaram a formação de emulsões múltiplas, com a existência de gotas dentro de outras gotas. A emulsão múltipla constituída pela mistura da emulsão O/A com a

solução FS1FI3 apresentou estrutura composta por duas fases aquosas, contendo pequenas gotículas de óleo distribuídas ao longo de todo o sistema. A partir da imagem com aumento de 200 vezes pode-se notar melhor a separação das soluções aquosas, enquanto que com o aumento de 500 vezes pode-se observar as gotas de óleo, sendo que as mesmas pareceram estar mais acumuladas na fase contínua. Neste caso, o sistema formado pela mistura de uma emulsão  $O/A_1$  com uma outra emulsão  $A_2/A_1$ , onde O é óleo,  $A_1$  é solução de Na-CN e  $A_2$  é solução de LBG, resultou na formação de grandes gotas aquosas ( $A_2$ ) e pequenas gotas de óleo (O) dispersas em uma mesma fase contínua aquosa ( $A_1$ ). Já a emulsão contendo a mistura FS2FI2 (Figura 4.31) apresentou uma estrutura bastante similar à composta pela solução FS1FI3, porém as gotas aquosas apresentaram tamanho bem maior e, comparando com os resultados obtidos para as emulsões A/A (Figura 4.28), pode-se supor que o meio contínuo era rico em polissacarídeo, enquanto que as gotas apresentavam-se ricas em proteína. Além disso, neste caso, as gotas de óleo apresentaram-se homogeneamente distribuídas em ambas as fases. Já a emulsão múltipla composta pela solução FS3FI1 apresentou a formação de gotas aquosas com um formato bastante arredondado, diferentemente dos outros sistemas analisados. Além disso, apesar de também existirem gotas de óleo na fase contínua, a maior parte delas se encontrava na fase dispersa. Neste caso, como houve a mistura de uma emulsão  $O/A_1$  com uma outra emulsão  $A_1/A_2$ , foi obtido um sistema  $O/A_1/A_2$ , em que pequenas gotas de óleo (O) ficaram dispersas em gotas aquosas maiores ( $A_1$ ), as quais estavam dispersas em um meio contínuo também aquoso ( $A_2$ ). Estes resultados foram similares aos observados por Kim et al. (2006) para emulsões múltiplas formadas a partir de soluções de proteína de soja desnaturada e pectina.



## **CAPÍTULO 5. Conclusões gerais**





A partir dos resultados obtidos para as emulsões O/A estabilizadas por caseinato de sódio, pode-se concluir que diversos fatores afetaram a estabilidade deste tipo de sistema. Em geral, o aumento nas concentrações de óleo e biopolímeros (proteína e polissacarídeo) na solução inicial resultou em uma maior estabilidade das emulsões devido ao aumento da viscosidade e, conseqüentemente, diminuição na mobilidade das gotas. Em relação à homogeneização a altas pressões, observou-se que todas as emulsões produzidas sob estas condições foram estáveis, independente da pressão aplicada, sendo este fato explicado pela redução do tamanho das gotas. Em relação ao pH das emulsões, pode-se concluir que existe um aumento na estabilidade das emulsões conforme o pH das mesmas aproxima-se do ponto isoelétrico das proteínas, já que as moléculas de proteína adsorvidas na superfície tendem a se ligar, havendo a formação de uma rede elástica. Finalmente pode-se concluir que é possível a produção de emulsões estáveis utilizando-se apenas biopolímeros como emulsificantes e estabilizantes.

Em relação aos sistemas aquosos, os sistemas formados por caseinato de sódio e jataí apresentaram uma alta compatibilidade em pH 7,0. Assim, para a formação de soluções com fases separadas, foi preciso alterar o pH e/ou a força iônica do sistema, sendo observada uma incompatibilidade termodinâmica para forças iônicas superiores à 0,1 mol/L e para pHs inferiores à 6,0. Em relação aos tipos de acidificação do sistema, pode-se concluir que a acidificação lenta com adição de GDL promoveu uma maior separação de fases, quando comparada a acidificação direta das soluções mistas. A partir das soluções de fases separadas, foi possível a produção de emulsões A/A, as quais se mostraram bastante instáveis, apresentando separação de fases poucos minutos após seu preparo. Além disso, verificou-se que estas emulsões apresentaram diferentes microestruturas e comportamentos reológicos, dependendo da razão de fase superior e fase inferior que foi utilizada para o seu preparo.

O estudo das emulsões múltiplas mostrou que diferentes tipos de sistemas podem ser formados pela mistura de uma emulsão óleo-água (O/A) com diferentes soluções de fases separadas. As emulsões múltiplas produzidas foram do tipo  $O/A_1-A_2/A_1$ , onde gotas de óleo e de água estão dispersas em um meio contínuo aquoso, ou do tipo  $O/A_1/A_2$ , onde gotas de óleo estão dispersas em gotas de água, as quais estão dispersas em um meio contínuo aquoso. Esse tipo de emulsão pode ter uma variedade de aplicações na indústria de alimentos como, por

exemplo, a criação de novas estruturas para produtos com teor reduzido de gordura, ou encapsulação com liberação controlada de componentes bioativos.



## **CAPÍTULO 6. Referências Bibliográficas**



- ALLEN, K.E., DICKINSON, E., MURRAY, B. Acidified sodium caseinate emulsion foams containing liquid fat: A comparison with whipped cream. **LWT – Food Science and Technology**, v. 39, p. 225-234, 2006.
- ANTONOV, Y. A., VAN PUYVELDE, P., MOLDENAERS, P. Interfacial tension of aqueous biopolymers mixtures closed to the critical point. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 34, p. 29-35, 2004.
- ANTONOV, Y.A., LEFEBVRE, J., DOUBLIER, J-L. On the One-phase state of aqueous protein-uncharged polymer systems: casein-guar gum systems. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 71, p. 471-482, 1999.
- AOAC. Dairy Products. In: **Official Method of Analysis of AOAC International**, 16th edition, v.2., 1996.
- ATKINS, P.W. **Physical Chemistry**, 5th ed., Oxford University Press, Oxford, UK, 1994.
- BENICHO, A., ASERIN, A., GARTI, N. W/O/W double emulsions stabilized with WPI – polysaccharide complexes. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical Aspects**, v. 294, p. 20-32, 2007.
- BLIGH, E. G., DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal Biochemistry Physiology**, v.37, p.911-917, 1959.
- BOURRIOT, S., GARNIER, C., DOUBLIER, J-L. Phase separation, rheology and structure of micellar casein-galactomannan mixtures. **International Dairy Journal**, v. 9, p. 353-357, 1999.
- BRAGA, A.L.M., MENOSSE, M., CUNHA, R.L. The effect of the glucono- $\delta$ -lactone/caseinate ratio on sodium caseinate gelation. **International Dairy Journal**, v.16, p.389-398, 2006.
- BRYANT, C.M., MCCLEMENTS, D.J. Influence of xanthan gum on physical characteristics of heat denaturated whey protein solutions and gels. **Food Hydrocolloids**, v.14, p.383-390, 2000.
- BUCHHEIM, W. Ultrastructure of interfacial layers in O/W – type food emulsions. **Abstracts of Papers of the American Chemical Society**, v.199, p.72 – AGFD, 1990.
- CAVALLIERI, A.L.F., CUNHA, R.L. The effects of acidification rate, pH and ageing time on the acidic cold set gelation of whey proteins. **Food Hydrocolloids**, v.22, p.439-448, 2008.
- CHEFTEL, J.C., CUQ, J.L., LORIENT, D. Aminoácidos, peptidos y proteínas. In: Fennema O.R. (Ed.), **Química de los alimentos**, Editorial Acribia, Zaragoza, p. 275-414, 1996.
- CHEN, J., DICKINSON, E., EDWARDS, M. Rheology of acid-induced sodium caseinate stabilized emulsion gels. **Journal of Texture Studies**, v.30, p.377-396, 1999.
- DALGLEISH, D.G. Food Emulsions. In: **Emulsions and Emulsion Stability**, Sjoblom, J., Ed., Marcel Dekker, New York, 1996.

- DE KRUIF, C. G.; TUINIER, R. Polysaccharide protein interactions. **Food Hydrocolloids**, v.15, p.555-563, 2001.
- DICKINSON, E. **An introduction to food hydrocolloids**, Oxford, UK: University Press chapter 1, 1992.
- DICKINSON, E. Caseins in emulsions: interfacial properties and interactions. **International Dairy Journal**, v.9, p.305-312, 1999.
- DICKINSON, E. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. **Food Hydrocolloids**, v.17, p.25-39, 2003.
- DICKINSON, E., GOLDING, M., POVEY, J.W. Creaming and flocculation of oil-in-water emulsions containing sodium caseinate. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.185, p.515-529, 1997.
- DICKINSON, E., MCCLEMENTS, D.J. **Advances in food colloids**. Glasgow: Blackie Academic and Professional, 1995.
- DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. A., SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, p.350-356, 1956.
- FANG, Y., DALGLEISH, D.G. Dimensions of the adsorbed layers in oil-in-water emulsions stabilized by caseins. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.156, p.329-334, 1993.
- FORD, L. D., BORWANKER, R., MARTIN JR., R. W., HOLCOMB, G. N. In: S. E. Friberg, K. Larsson (Eds.), **Dressing and sauces in food emulsions**, Chap 8, (3rd ed.). New York (Basel): Dekker (Marcel), 1997.
- GARTI, N. Progress in stabilization and transport phenomena of double emulsions in food applications. **Food Science and Technology**, v.30, p.222-235, 1997.
- GARTI, N., BENICHO, A. Recent developments in double emulsions for food applications. In: S.E. Friberg, K. Larsson, J. Sjoblom (Eds.), **Food emulsions 4th ed**. New York: Marcel Dekker, 2004.
- GARTI, N., LESER, M.E. Emulsification properties of hydrocolloids. **Polymers for Advanced Technologies**, v.12, p.123-135, 2001.
- GLICKSMAN, M. **Gum technology in food industry**. New York: Academic Press, 1969.
- GRINBERG, V.YA., TOLSTOGUZOV, V.B. Thermodynamic incompatibility of proteins and polysaccharides in solutions. **Food Hydrocolloids**, v.11, p.145-158, 1997.
- HILL, S.E. Emulsions. In G.M.Hall, **Methods of testing protein functionality**, New York: Blackie, 1996.
- HUNTER, R.J. **Introduction to Modern Colloid Science**, Oxford University Press, Oxford, UK, 1993.

- KEOWMANEECHAI, E., MCCLEMENTS, D.J. Influence of EDTA and citrate on physicochemical properties of whey protein-stabilized oil-in-water emulsions containing  $\text{CaCl}_2$ . **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.7145-7153, 2002.
- KIM, H.-J., DECKER, E.A., MCCLEMENTS, D.J. Preparation of multiple emulsions based on thermodynamic incompatibility of heat-denatured whey protein and pectin solutions. **Food Hydrocolloids**, v.20, p.586-595, 2006.
- LANEUVILLE, S.I., PAQUIN, P., TURGEON, S.L. Effect of preparation conditions on the characteristics of whey protein-xanthan gum complexes. **Food Hydrocolloids**, v.14, p.305-314, 2000.
- LANGTON, M., JORDANSSON, E., ALTSKÄR, A., SØRENSEN, C., HERMANSSON, A. – M. Microstructure and image analysis of mayonnaises. **Food Hydrocolloids**, v.13, p.113-125, 1999.
- LIAN, G.P., MALONE, M.E., HOMAN, J.E., NORTON, I.T. A mathematical model of volatile release in mouth from the dispersion of gelled emulsion particles. **Journal of Controlled Release**, v.98, p.139-155, 2004.
- MACOSKO, C.W. **Rheology: Principles, Measurements and Applications**, VCH Publishers, New York, NY, 1994.
- MALONE, M.E., APPELQVIST, I.A.M. Gelled emulsion particles for the controlled release of lipophilic volatiles during eating. **Journal of Controlled Release**, v.90, p.227-241, 2003.
- MALONE, M.E., APPELQVIST, I.A.M., NORTON, I.T. Oral behaviour of food hydrocolloids and emulsions. Part 2. Taste and aroma release. **Food Hydrocolloids**, v.17, p.775-784, 2003.
- MANDALA, I.G., SAVVAS, T.P., KOSTAROPOULOS, A.E. Xanthan and locust bean gum influence on the rheology and structure of a white model-sauce. **Journal of Food Engineering**, v.64, p.335 – 342, 2004.
- MCCLEMENTS, D.J. Comments on viscosity enhancement and depletion flocculation by polysaccharides. **Food Hydrocolloids**, v.14, p.173-177, 2000.
- MCCLEMENTS, D.J. **Food emulsions: principles, practice, and techniques**. Washington: CRC Press, 2005.
- MCCLEMENTS, D.J. Non-covalent interactions between proteins and polysaccharides. **Biotechnology Advances**, v.24, p.621–625, 2006.
- MCKENNA, B.M., LYNG, J.G. Introduction to food rheology and its measurements. In: **Texture in Food, Volume 1: Semi-solid foods**, McKenna, B.M., Ed, CRC Press, Boca Raton, cap. 6, 2003.
- MEWIS, J., MACOSKO, C.W. Suspension rheology. In: **Rheology: Principles, Measurements and Applications**, Macosko, C.W., Ed., VCH Publishers, New York, Chap. 10, 1994.

- MOSCHAKIS, T., MURRAY, B.S., DICKINSON, E. Microstructural evolution of viscoelastic emulsions stabilized by sodium caseinate and xanthan gum. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.284, p.714-728, 2005.
- MUSAMPA, R.M., ALVES, M.M., MAIA, J.M. Phase separation, rheology and microstructure of pea protein – kappa -carrageenan mixtures. **Food Hydrocolloids**, v. 21, p. 92 – 99, 2007.
- NEIRYNCK, N., VAN LENT, K., DEWETTINCK, K., VAN DER MEEREN, P. Influence of pH and biopolymer ratio on sodium caseinate-guar gum interactions in aqueous solutions and in O/W emulsions. **Food Hydrocolloids**, v.21, p.862-869, 2007.
- NEWSTEIN, M.C., WANG, H., BALSARA, N.P., LEFEBVRE, A.A., SHNIDMAN, Y., WATANABE, H., OSAKI, K., SHIKATA, T., NIWA, H., MORISHIMA, Y. Microstructural changes in a colloidal liquid in the shear thinning and shear thickening regimes. **Journal of Chemical Physics**, v.111, p.4827, 1999.
- NORTON, I.T., FRITH, W.J. Microstructure design in mixed biopolymer composites. **Food Hydrocolloids**, v.15, p.543-553, 2001.
- OLIVEIRA, J.A., OLIVEIRA, T.T., NAGEM, T.J., PINTO, A.S., PINTO, J.G. Extração, estabilidade, identificação e testes biológicos do carmim. **23ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2000. Disponível em: <http://www.sbq.org.br/ranteriores/23/resumos/1283/index.html>. Acesso em 08/01/2008.
- POLYAKOV, V.I., GRINBERG, V.Ya., TOLSTOGUZOV, V.B. (1980). Application of phase-volume-ratio method for determining the phase diagram of water-casein soybean globulins system. **Polymer Bulletin**, 2, 757 – 760.
- PUGNALONI, L.A., MATIA-MERINO, L., DICKINSON, E. Microstructure of acid-induced caseinate gels containing sucrose: quantification from confocal microscopy and image analysis. **Colloid Surface B**, v.42, p.211-217, 2005.
- RAO, M.A. **Rheology of fluids and semisolid foods**, Kluwer Academic Publishers, New York, 1999.
- SAGIS, L.M.C. Nonequilibrium thermodynamic model of water-in-water emulsions. **Journal of Physical Chemistry**, v.111, p.3139-3145, 2007.
- SCHMITT, C., SANCHEZ, C., DESOBRY-BANON, S., HARDY, J. Structure and technofuntional properties of protein-polysaccharide complexes: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 38, p. 689-753, 1998.
- SCHOLTEN, E., SPRAKEL, J., SAGIS, L.M., VAN DER LINDEN, E. Effect of interfacial permeability on droplet relaxation in biopolymer-based water-in-water emulsions. **Biomacromolecules**, v.7, p.339-346, 2006.

- SGARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações e modificações**. Livraria Varela Ltda, São Paulo, p.139-157, 1996.
- SIMEONE, M., ALFANI, A., GUIDO, S. Phase diagram, rheology and interfacial tension of aqueous mixtures of Na-caseinate and Na-alginate. **Food Hydrocolloids**, v.80, p.463-470, 2004.
- SPAGNUOLO, P.A., DALGLEISH, D.G., GOFF, H.D., MORRIS, E.R. Kapa-carrageenan interactions in systems containing casein micelles and polysaccharide stabilizers. **Food Hydrocolloids**, v.19, p.371-377, 2005.
- STEFFE, J. F. **Rheological methods in food process engineering**. Michigan: Freeman Press, 2a ed, 1996.
- SUN, C., GUNASEKARAN, S., RICHARDS, M.P. Effect of xanthan gum on physicochemical properties of whey protein isolate stabilized oil-in-water emulsions. **Food Hydrocolloids**, v.21, p.555-564, 2007.
- SURH, J., DECKER, E.A., MCCLEMENTS, D.J. Properties and stability of oil-in-water emulsions stabilized by fish gelatin. **Food Hydrocolloids**, v.20, p.596-606, 2006.
- TOLSTOGUZOV, V. Composition and phase diagrams for aqueous systems based on proteins and polysaccharides. **International Reviews of Cytology – A Survey of Cell Biology**, v.192., p.3-31, 2000.
- TOLSTOGUZOV, V. Why were polysaccharides necessary? **Origins of Life and Evolution of the Biosphere**, v.34, p.571-597, 2004.
- TOLSTOGUZOV, V. Texturising by phase separation. **Biotechnology advances**, v.24, p.626 – 628, 2006.
- TOLSTOGUZOV, V. Some thermodynamic considerations in food formulation. **Food Hydrocolloids**, v.17, p.1-23, 2003.
- TORRES, L.G., ITURBE, R., SNOWDEN, M.J., CHOWDHRY, B.Z., LEHARNE, S.A. Preparation of o/w emulsions stabilized by solid particles and their characterization by oscillatory rheology. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical Aspects**, v.302, p.439-448, 2007.
- VAN VLIET, T. Mechanical properties of concentrated food gels. In: **Food Macromolecules and Colloids**, Dickinson, E., Lorient, D., Eds., Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1995.
- VANAPALLI, S.A., COUPLAND, J.N. Orthokinetic stability of emulsions. In: **Food Emulsions 4th ed.**, Friberg, S., Larsson, K., Sjoblom, J., Eds., Marcel Dekker, New York, NY, Chap. 9, 2004.
- WALSTRA, P. **Dairy Technology: Principles of Milk Properties and Processes**, Marcel Dekker, New York, NY, 1999.
- WALSTRA, P. **Physical Chemistry of Foods**, Marcel Dekker, New York, NY, 2003.

WIELINGA, W.C., MAEHALL, A.G. Galactomannans. In: Phillips, G.O., Williams, P.A. **Handbook of hydrocolloids**. Woodhead Publishing Limited, cap. 8, 2000.

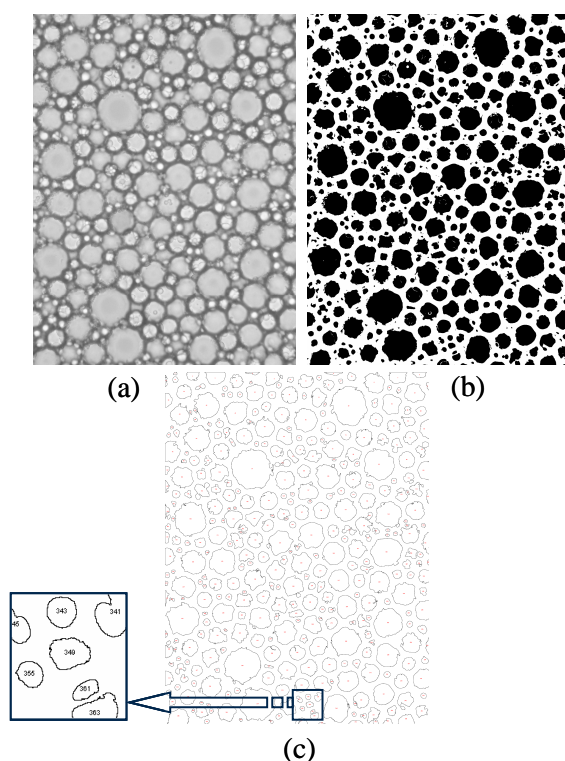


## **ANEXO 1. Metodologias para determinação do tamanho médio de gotas**



## ANÁLISE DE IMAGENS

Para a determinação do tamanho das gotas através de análise de imagens, as microscopias tiveram que ser primeiramente convertidas para uma escala de cinza (Figura Aa). Após isso, as imagens foram binarizadas (“thresholded”) (Figura Ab), sendo esta etapa a mais importante para os tratamentos de imagens pois define os pontos que pertencem à figura e àqueles que simplesmente fazem parte do fundo da imagem. Quando o nível de cinza (GL) é maior ou igual ao nível de “threshold” (TL), este ponto é considerado ser parte do objeto. Por outro lado, um ponto com  $GL < TL$  é considerado ser parte do fundo da imagem. Para haver uma padronização, considerou-se o TL como sendo a mediana da distribuição de GL para todas as imagens (Figura B).

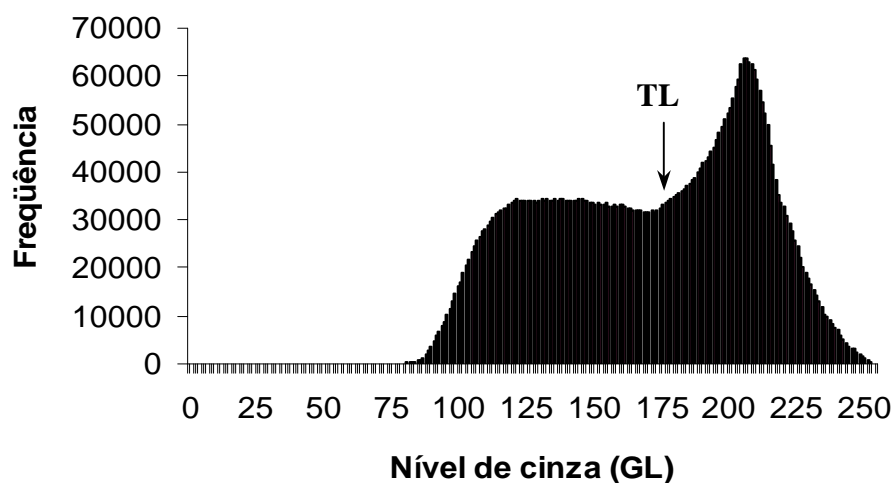


**Figura A.** Tratamento de imagens. a) Microscopia em nível de cinza, b) microscopia em nível de “threshold”, c) partículas medidas através da análise de imagens (“outline”).

Após a binarização, os valores dos pontos foram convertidos em micrômetros através da escala da figura e, através de uma ferramenta de análise de partículas, foram quantificados valores de área das gotas, perímetro e circularidade. A circularidade é calculada como

$4 \cdot \pi \cdot \left( \frac{\text{área}}{\text{perímetro}^2} \right)$  e este valor pode variar de 0 a 1, sendo que quanto mais próximo de 1, mais

a partícula se aproxima de um círculo perfeito. No momento em que os dados são apresentados existe uma opção chamada “outline”. Selecionando-se esta opção, as partículas medidas aparecem numeradas, juntamente com os valores correspondentes a elas (Figura Ac).



**Figura B.** Distribuição do nível de cinza (GL) de uma imagem e nível de “threshold” utilizado na análise da imagem

A partir destas análises pode-se verificar que existem pequenas partículas que são medidas pelo “software”, mas que não representam gotas de óleo. Além disso, foram observadas partículas com circularidade negativa, as quais também não representam as gotículas. Assim, para a obtenção de uma distribuição de tamanho de gotas coerente, as partículas foram limitadas a uma área acima de  $3,5 \mu\text{m}^2$  e circularidade  $> 0$ .

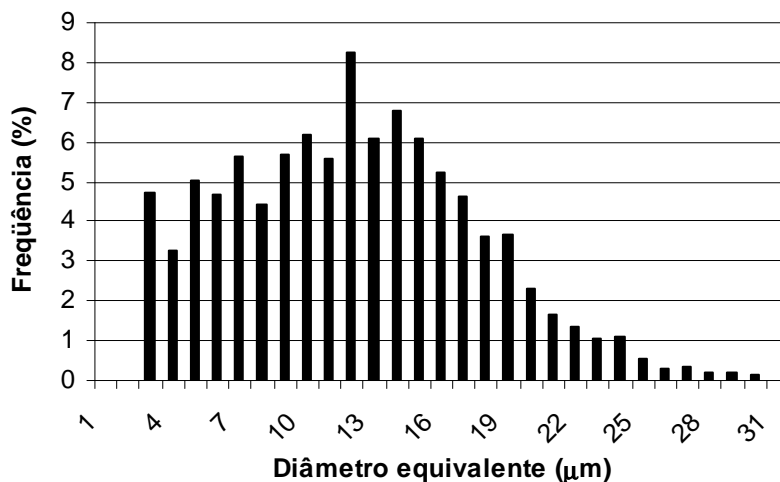
A partir dos resultados obtidos através do programa (área das gotas), pode-se calcular o diâmetro equivalente para cada uma das gotas medidas, considerando que as mesmas representam círculos perfeitos (equação 12).

$$d = \sqrt{\frac{4 \cdot A}{\pi}} \quad (12)$$

onde A é a área das gotas obtida pelo programa.

Assim, a partir dos valores de diâmetro das gotas, pode-se construir um histograma de distribuição de tamanho de gotas. Nos histogramas, a altura de cada barra representa a quantidade de gotas presentes na classe de tamanho estipulada, enquanto que a posição central

de cada barra no eixo x representa a média do tamanho de gotas desta classe de tamanho. A Figura C apresenta um exemplo de histograma resultante da análise de imagem da microscopia de uma emulsão composta por 10% de óleo e 1% de caseinato de sódio.



**Figura C.** Distribuição do tamanho de partículas de uma emulsão composta por 1 % (m/v) de caseinato de sódio e 10% (v/v) de óleo.

Finalmente, a partir dos histogramas construídos para cada amostra, pode-se calcular os valores de diâmetro médio. Um parâmetro amplamente utilizado para expressar tamanho médio de partículas é o diâmetro médio superficial ( $d_{32}$ ) (equação 13), o qual é definido como a área superficial média das gotas expostas à fase contínua por unidade de volume da emulsão (MCCLEMENTS, 2005).

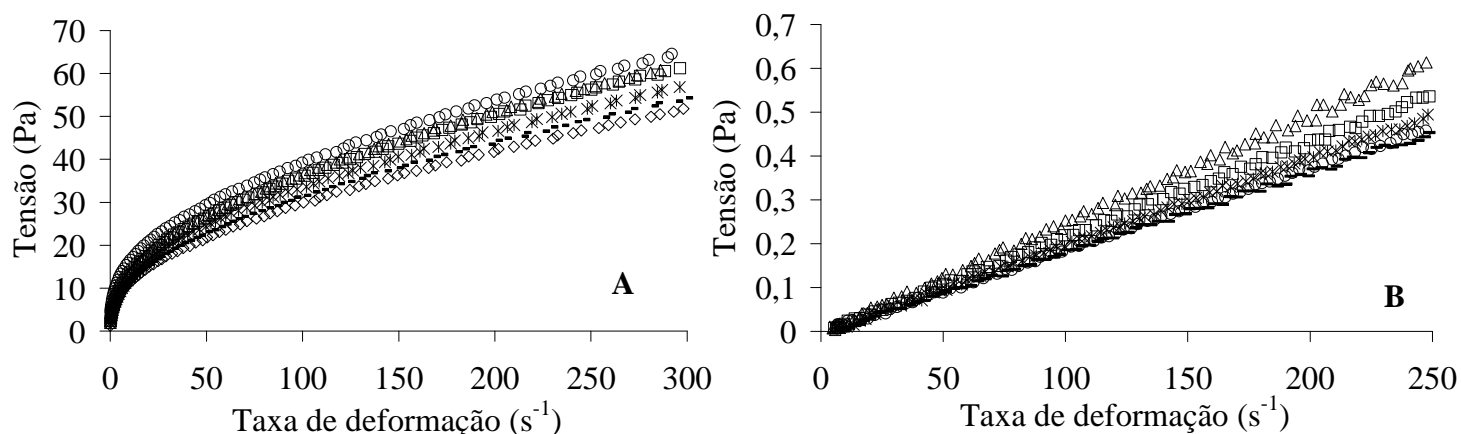
$$d_{32} = \frac{\sum n_i d_i^3}{\sum n_i d_i^2} \quad (13)$$



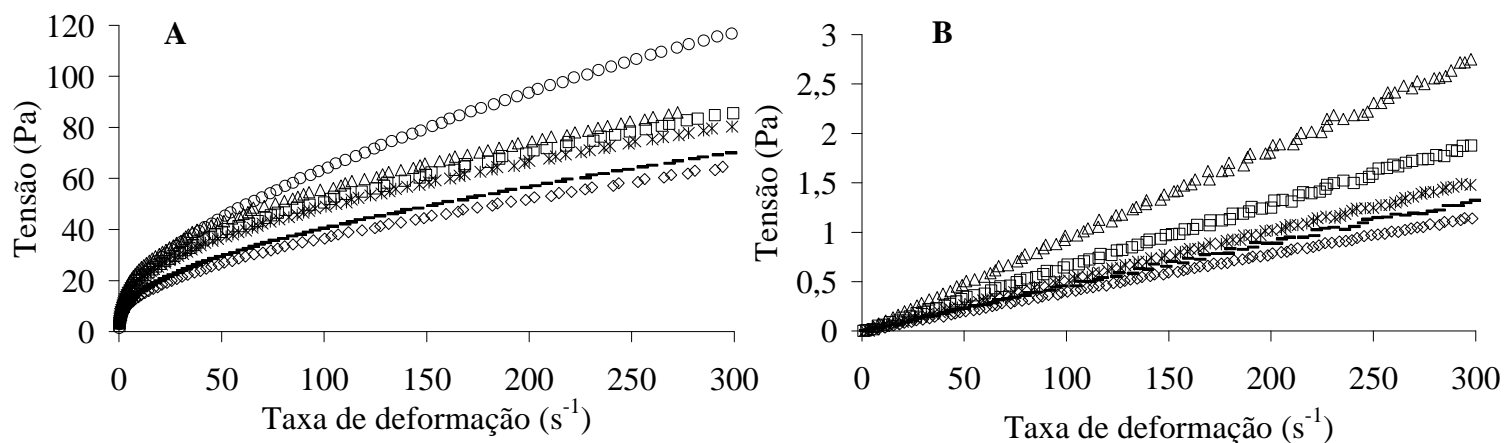
**ANEXO 2. Medidas reológicas das emulsões estabilizadas por 1 e 4 % (m/v)  
Na-CN com variadas concentrações de óleo (10 a 60 % v/v) em pH 7,0**







**Figura D.** Propriedades reológicas das emulsões O/A estabilizadas por 1 % (m/v) Na-CN com diferentes concentrações de óleo. A) curvas de escoamento da fase superior das emulsões e B) curvas de escoamento da fase inferior das emulsões. Concentração de óleo: ( $\diamond$ ) 10 %, ( $-$ ) 20 %, ( $\times$ ) 30 %, ( $\square$ ) 40 %, ( $\triangle$ ) 50 % e ( $\circ$ ) 60 % (v/v).

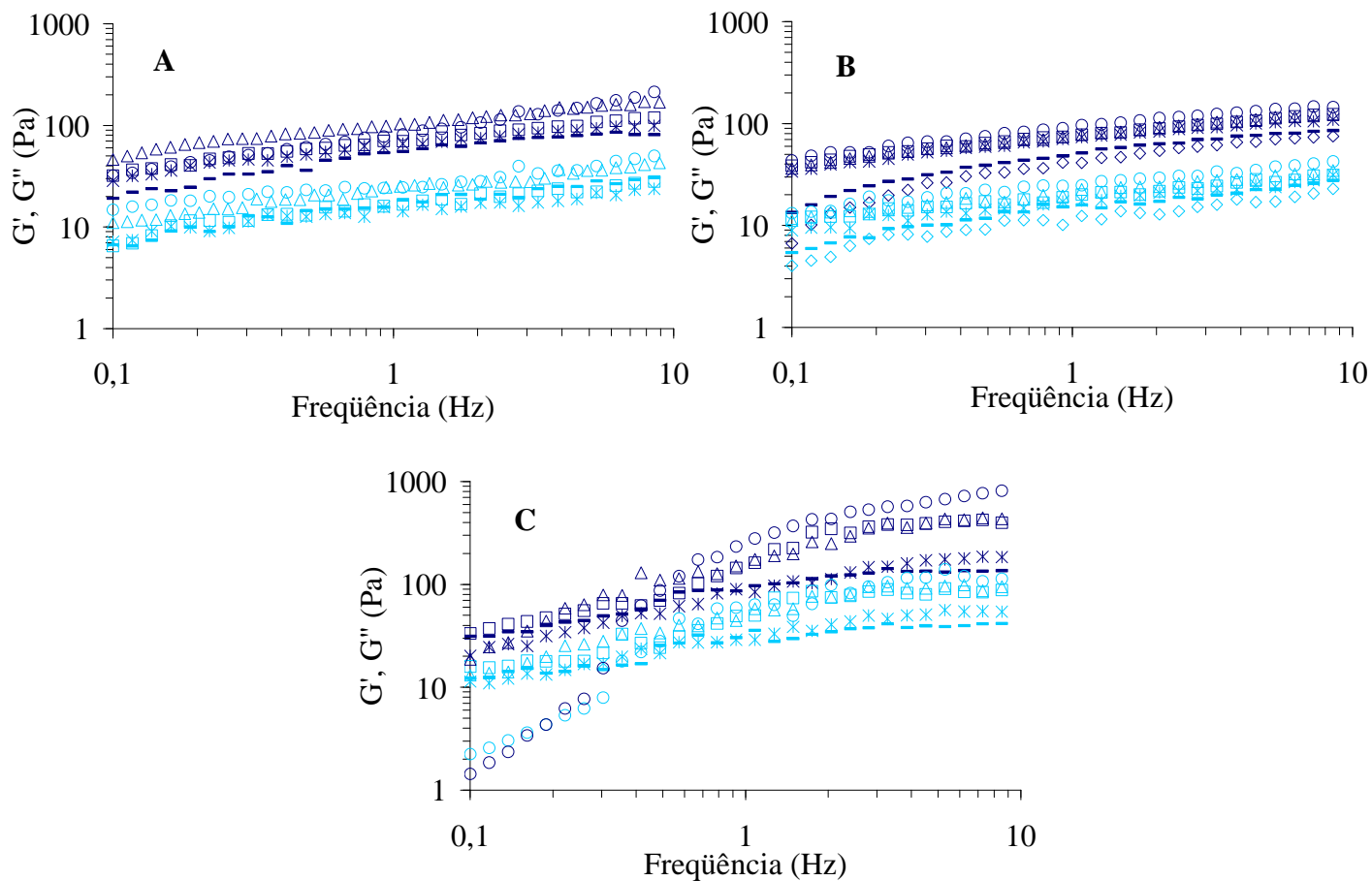


**Figura E.** Propriedades reológicas das emulsões O/A estabilizadas por 4 % (m/v) Na-CN com diferentes concentrações de óleo. A) curvas de escoamento da fase superior das emulsões e B) curvas de escoamento da fase inferior das emulsões. Concentração de óleo: ( $\diamond$ ) 10 %, ( $-$ ) 20 %, ( $\times$ ) 30 %, ( $\square$ ) 40 %, ( $\triangle$ ) 50 % e ( $\circ$ ) 60 % (v/v).



**ANEXO 3. Medidas reológicas oscilatórias das emulsões estabilizadas por 1, 1,4 e 4 % (m/v) Na-CN com variadas concentrações de óleo (10 a 60 % v/v) em pH 7,0**





**Figura F.** Variação de  $G'$  (símbolos azul escuros) e  $G''$  (símbolos azul claros) com a frequência para emulsões O/A estabilizadas por A) 1 % (m/v) Na-CN, B) 1,4 % (m/v) Na-CN e C) 4 % (m/v) Na-CN. Concentração de óleo: ( $\diamond$ ) 10 %, ( $-$ ) 20 %, ( $\times$ ) 30 %, ( $\square$ ) 40 %, ( $\triangle$ ) 50 % e ( $\circ$ ) 60 % (v/v).